ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. IX No 3

1 9 6 0

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
4 JUL 1961

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. IX No 3

1960
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek rzeczywisty PAN — Lublin, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Wrocław, Eugeniusz Pijanowski, członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Radaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Dział rolny — J. Gołębiowska, Poznań
Dział przemysłowy — J. Jakubowska, Łódź i S. Bujak, Lublin

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
ODDZIAŁ WROCŁAWSKI

Nakład 1044+126 egz.	Oddano do składania 17. VIII. 1960 r.
Ark. wyd. 4,75, ark. druk. 4,25.	Podpisano do druku 9. XII. 1960 r.
Papier druk. sat. kl. III, 80 g.	Druk ukończono w grudniu 1960 r.
Cena zł 25,–	Nr zam. 201/60 H-15

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9: 235—238

PROF. DR KAZIMIERZ BASSALIK
12 VI 1879 — 27 VI 1960

Po przeszło 50 latach twórczości naukowej zmarł w Warszawie nestor mikrobiologów polskich, Kazimierz Bassalik — profesor zwyczajny Uniwersytetu Warszawskiego, członek rzeczywisty Polskiej Akademii Nauk, członek wielu towarzystw naukowych krajowych i zagranicznych, laureat państwowej nagrody naukowej I stopnia. Zmarł, pełniąc do ostatniej chwili funkcję kierownika Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego.

Z wykształcenia leśnik i biolog, Kazimierz Bassalik już w pierwszych latach działalności naukowej jasno ukształtował swe zainteresowania i zamiłowania badawcze. Specjalnością Jego staje się fizjologia roślin i najszerzej rozumiana mikrobiologia ogólna. Zagadnieniom tym poświęcił wiele prac badawczych, w dyscyplinach tych wykształcił kilka pokoleń uczniów i współpracowników, przedmioty te wykładał na Uniwersytecie Warszawskim od 1919 r. po niemal dzień dzisiejszy.

Kazimierz Bassalik był uczniem najwybitniejszego w swoim czasie mikrobiologa niemieckiego, Alfreda Fischera. W pracowni Fischera w Bazylei rozpoczął prace nad rolą dżdżownic w wytwarzaniu próchnicy glebowej. Opracował szereg szczepów drobnoustrojów wyodrębnionych z przewodu pokarmowego dżdżownic, stwierdzając m. in. u niektórych drobnoustrojów zdolność do asymilowania potasu uwalnianego z rozkładanych przez te drobnoustroje glinokrzemianów. Prace nad drobnoustrojami tego typu stały się znów przedmiotem zainteresowań mikrobiologów w ostatnich latach.

Szczególnie interesujące i nowatorskie były ówczesne badania Bassalika nad wyodrębnioną, również z przewodu pokarmowego dżdżownicy, bakterią, określoną przez Profesora jako *Vibrio extorquens*. Bakteria ta może wykorzystywać jako jedyne źródło węgla nawet nierozpuszczalne szczawiany, utleniając je do dwutlenku węgla i wody. Bassalik wysunął wówczas tezę, że węgiel zawarty w składnikach komórkowych *Vibrio (Pseudomonas) extorquens* pochodzi z dwutlenku węgla asymilowanego przez bakterie kosztem energii wyzwolonej przy utlenianiu szczawianów. Udowodnienie tej hipotezy było przy ówczesnym poziomie techniki badawczej niemożliwe, a sama myśl była tak śmiała, że Fischer nie zgodził się na opublikowanie pracy. Ukazała się ona drukiem dopiero po śmierci

Fischera. Hipoteza wysunięta przez Bassalika została udowodniona eksperymentalnie przez innych badaczy dopiero w czasach nam współczesnych — wprawdzie na innym drobnoustroju — dzięki zastosowaniu techniki izotopowej. W pracowni Fischera zostały również zainicjowane przez Profesora pionierskie prace nad drobnoustrojami rozkładającymi fenol i benzen. Do problematyki zapoczątkowanej w okresie bazylejskim powracał Profesor wielokrotnie w latach późniejszych.

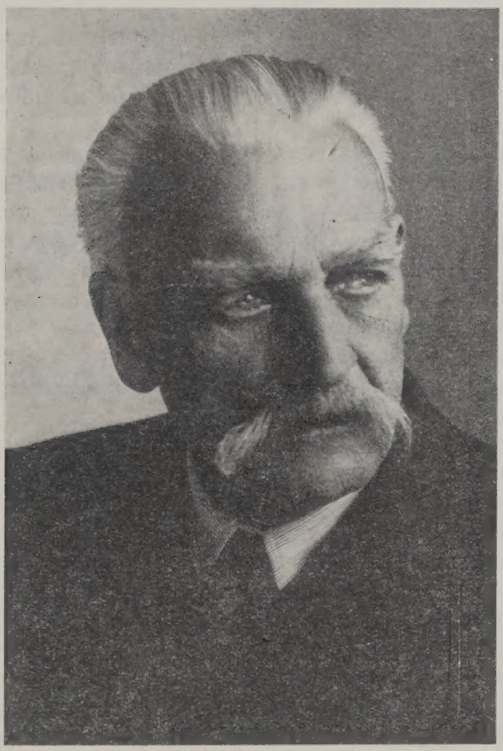
W okresie warszawskim prace szkoły Bassalika koncentrują się wokół dwóch zasadniczych kierunków: badania czynników stymulujących rozwój roślin i drobnoustrojów oraz problemy ekologiczne, zmierzające do scharakteryzowania wzajemnych stosunków między drobnoustrojami w różnych środowiskach.

Prace nad „biosem" rozpoczął Bassalik już w 1913 r. Z lat międzywojennych pochodzą, mające charakter podstawowy, badania własne nad istotą działania stymulującego różnych czynników występujących w glebie na szereg organizmów — w tym na bakterie wiążące azot molekularny. Pracom osobistym Profesora towarzyszyły badania uczniów. Poglądy Bassalika na niektóre zagadnienia stymulacji znalazły wyraz w opracowaniach: „Zur Auximonfrage" oraz „Bios, auksymony, witaminy i koloidy w świetle badań nad wiązaniem azotu przez *Azotobacter chroococcum* Beijerinck".

Szczególnie ciekawe są zainicjowane przez Profesora i rozwiązywane przy Jego bezpośrednim udziale badania nad problematyką ekologiczną. W Zakładzie udało się wyhodować i utrzymać przy życiu, w specjalnie skonstruowanej i stosunkowo prostej aparaturze, jałowe zwierzęta: muchy, następnie kury; rozpoczęto również prace nad jałową hodowlą szczurów. Badania te (prace Natana Balsama), oparte o nowoczesne poglądy na żywienie, umożliwiły uzyskanie zwierząt wolnych od drobnoustrojów, a równocześnie w pełni normalnych. Sądząc z ówczesnej literatury światowej, prace te miały w dużym stopniu charakter pionierski i są po dzień dzisiejszy przedmiotem zainteresowań specjalistów.

W pracowni Bassalika prowadzone były również badania nad zjawiskiem antagonizmu między drobnoustrojami. U wyodrębnionej w Zakładzie *Bacterium cepae* powodującej zgniliznę cebuli, stwierdzono silne własności antybiotyczne w stosunku do szeregu drobnoustrojów. Przeprowadzono szczegółowe badania nad biologią tego drobnoustroju, ustalono jego widmo antybiotyczne i wyprodukowano — tuż przed wybuchem wojny — z podłoża hodowlanego koncentrat o silnych własnościach bakteriobójczych. Już prace wstępne, a także i plan dalszych badań odpowiadał zakresem zainteresowań dzisiejszym, nowoczesnym badaniom nad antybiotykami, mimo iż były to jedne z pierwszych na świecie prac nad tym problemem.

Obok badań nad jałową hodowlą zwierząt i nad antybiozą prowadzone były prace szczegółowe nad wzajemnymi stosunkami między różnymi drobnoustrojami (m. in. stosunki między azotobakterem a „towarzyszem").



Z innych badań na wspomnienie zasługują prace nad fizjologią wielu drobnoustrojów wiążących azot atmosferyczny (m. in. wieloletnie osobiste badania Profesora nad bilansem azotowym zbiorników wodnych), nad drobnoustrojami celulolitycznymi, nad fermentacją cytrynową i octową, nad wpływem promieniowania na drobnoustroje, nad mikrobiologicznym rozkładem alkaloidów, nad świeceniem bakterii, nad systematyką *E. coli* itd. itd. Prace fizjologiczne, biochemiczne, cytologiczne, taksonomiczne, ekologiczne — to mikrobiologia ogólna w pełnym słowa tego znaczeniu.

Po wyzwoleniu Warszawy Profesor odbudowuje swój Zakład, inicjuje dalsze badania, wracając wielokrotnie do swej tradycyjnej lecz wciąż aktualnej problematyki.

Prof. dr Kazimierz Bassalik był wszechstronnie i głęboko wykształconym biologiem. Śledząc literaturę światową, obdarzony niezwykłą pamięcią, był nieocenionym źródłem wiadomości i inspiracji dla swych uczniów i współpracowników. Krytyczny w stosunku do prac cudzych i własnych, poddawał dane z literatury i prace zakładowe świetnej, ale bardzo surowej analizie metodycznej. Dyskusje prowadzone na seminariach w Katedrze były znakomitą, niezapomnianą szkołą dla tych, którzy przy Nim pracowali. Uczono się tu myślenia naukowego, tu poznawano wartość uogólnień.

Prof. dr Kazimierz Bassalik wychował liczne grono mikrobiologów. Nie był efektownym wykładowcą. Mówił z trudem i jak gdyby z oporami — niechętnie. (Przyznał, że mimo wielkiej rutyny wykładowczej do końca odczuwał tremę przed wykładem). Wykład Jego był jednak bogaty w treść, fakty były poddawane analizie, a w zwykłym kursowym wykładzie spotykało się nieraz nowatorskie myśli, nie zawsze doceniane przez słuchaczy. (Pamiętam sprzed lat blisko 30 opis obrazu nasuwającego myśl o istnieniu rozmnażania płciowego u bakterii i próbę jego interpretacji w pełni aktualną i dziś w świetle współczesnej wiedzy o koniugacji u bakterii).

Wielkie walory dydaktyczne Profesora ujawniały się jednak nie na wykładach, lecz w trakcie kierowania pracami dyplomowymi. Zachowując formy pełnej samodzielności dyplomanta, Bassalik krok za krokiem wprowadzał badacza w tok pracy, budził zainteresowania przeradzające się w zamiłowanie, wpajał trudną umiejętność selekcji oraz oceny materiału, zmuszał niejednokrotnie do odrzucania owoców długotrwałych wysiłków, zachęcał do kontroli, do modyfikacji doświadczeń wyjaśniających, uczył ostrożności, a równocześnie śmiałości w formułowaniu wniosków.

Pracował naukowo przez przeszło pół wieku. Przeżył różne okresy rozwoju nauk biologicznych. Za Jego życia mikrobiologia z nauki opisowej przekształcała się w eksperymentalną. Za Jego życia dokonał się olbrzymi skok w rozwoju techniki badawczej.

Bassalik nie ulegał fluktuacjom mody naukowej. Miał tematy, które uważał za podstawowe w swej działalności i które konsekwentnie rozwijał. Do rozwiązywania jednak tych problemów wprzęgał w różnych okresach coraz to nowe metody. Był zawsze uczonym postępowym, był zawsze uczonym współczesnym.

Nauka polska, a mikrobiologia w szczególności, poniosła wraz ze śmiercią Profesora niepowetowaną stratę.

Doc. A. Drozdowicz
Zakład Mikrobiologii Rolniczej
SGGW w Warszawie

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9: 239—251

W. Nicewicz

POSTACIE PRZESĄCZALNE PRĄTKÓW GRUŹLICY I ICH ROLA W PROCESIE ZAKAŻENIA

Z Zakładu Mikrobiologii Wydziału Farmaceutycznego
Akademii Medycznej w Lublinie

Wpłynęło dnia 29 września 1959 r.

Wykrycie przez Klieneberger-Nobel tzw. fazy *L* u *Streptobacillus moniliformis* (1935, 1936, 1938, 1942, 1949) oraz liczne prace Dienesa nad formami *L* u wielu innych drobnoustrojów (1938, 1939, 1942, 1943, 1944, 1946, 1947, 1948, 1949, 1950, 1951), rzuciły nowe światło na zagadnienie przesączalności bakterii.

Klieneberger (1935, 1936), badając fazę *L* szczepu *Streptobacillus moniliformis*, wysunęła możliwość dwojakiej jej interpretacji: 1) formy *L* są fazą wzrostową szczepu, 2) są one symbiontami bakterii.

Klieneberger początkowo uważała pierwszą interpretację za zbyt śmiałą, przyjęła zatem drugą. Inni autorzy, jak Dawson i Hobby (1939), Heilman (1941), Ørskov (1942, 1947), a szczególnie Dienes (1938, 1939), przyjęli pierwszą interpretację i stanęli na stanowisku fazowości rozwoju badanych drobnoustrojów. Dalsze badania Dienesa (1943, 1944) oraz Dienesa i Smitha (1942) wykazały, że duże ciałka fazy *L* dzielą się i w rezultacie cały proces kończy się na reprodukcji bakterii. Klieneberger potwierdziła te obserwacje (1949) i uznała formy *L* za fazę rozwojową bakterii. Imszeniecki (1954), Kriwiski (1952) i Krasilnikow w dyskusji nad znaczeniem przesączalnej postaci drobnoustrojów wyrażają pogląd, że postać ta jest przejawem adaptacji drobnoustroju do niesprzyjających warunków. Spośród autorów radzieckich przesączalnymi formami bakterii zajmowali się również Kuprejczyk (1953) i Sołncewa (1953).

Już pierwsze prace opisujące przesączalne postacie bakterii wywołały duże zainteresowanie wśród mikrobiologów zajmujących się prątkami kwasoopornymi, a szczególnie prątkami gruźlicy. Zdawało się wówczas, że wiele niejasności w obserwacjach klinicznych można będzie wytłu-

maczyć przez poznanie roli fazy przesączalnej w ogólnym procesie zakażenia. Mimo nagromadzenia się dość znacznego materiału doświadczalnego nie ustalił się jednak jednolity pogląd na zagadnienie powstawania i roli fazy przesączalnej. Brak bowiem odpowiednich metod badawczych prowadził często do sprzecznych wyników i nie gwarantował ich powtarzalności.

DOŚWIADCZENIA Z PRZESĄCZAMI

Jednym z pierwszych badaczy, który zajmował się zagadnieniem przesączalności prątków kwasoopornych był Fontes (1910). Wstrzykiwał on świnkom morskim przesącze z zawiesin roztartych tkanek świnek zakażonych szczepem *H 37 Rv.* W pierwszym pasażu ukazywały się u świnek szczepionych obrzmienia węzłów chłonnych. W dalszych pasażach wykrywano w tkankach gruzełki gruźlicze. Wielu badaczy (Bezançon i Philibert 1926, Durand i Vaudremer 1924, Durand i Charchański 1925, Valtis 1924, Morin i Valtis 1926, Vaudremer 1923) powtórzyło doświadczenia Fontesa. Badając wpływ przesączów na zwierzęta (świnki morskie) obserwowano pewne reakcje jak: utrata wagi, podwyższenie temperatury lub obrzmienie węzłów chłonnych; nie były to jednak reakcje typowe. W pojedynczych tylko wypadkach uzyskiwano u zwierząt zmiany swoiste w pierwszym lub drugim pasażu.

Morin i Valtis (1926) wstrzykiwali filtrat prątka Johnego szczurom. Zwierzęta padły bez typowych objawów, a w ich organizmach znaleziono kwasooporne prątki.

Wszystkie podobne rezultaty zostały jednak podważone przez Coopera i Petroffa (1928), którzy na 15 badanych normalnych świnek u pięciu znaleźli kwasooporne prątki w węzłach chłonnych.

Hauduroy i Vaudremer (1923), Vaudremer (1923), Bezançon i Philibert (1926), Hauduroy (1946) przenosili filtraty hodowli na podłoża laboratoryjne i uzyskiwali wzrost. Hodowle były jednak nietypowe. Przesączami z hodowli kwasoopornych saprofitów zajmowali się Mellon i Fischer (1932), uzyskując śluzowaty wzrost niekwasoopornych organizmów, wytwarzających barwnik i utrzymujących się w tej postaci przez następne lata. Inni badacze (Arloing i Dufourt 1925, Cooper i Petroff 1928, Gloyne, Glover i Griffith 1929, Pinner i Voldrich 1931, Potter 1924, Sołtys i Taylor 1944, Vera i Rottger 1940) uzyskali wyniki negatywne. Z wyjątkiem Sołtysa i Taylora, którzy stosowali sączki gradokolowe — wszyscy pozostali używali filtrów Berkefelda lub Chamberlanda.

Dużą rolę formom ziarnistym prątków przypisywali Melassez i Vignal (1883). Szczepili oni zwierzęta doświadczalne materiałem

gruźliczym, w którym nie wykryto prątków, i uzyskiwali zmiany gruźlicze u tych zwierząt. Pojawienie się u świnek gruzełków gruźliczych po powtórnym pasażu przesączu obserwowali również Calmette i Valtis (1930). Plotz (1934), Walker i Sweeny (1934) nie potwierdzili wyników Calmette'a, wykrywając w przesączach hodowli normalne prątki.

Większość dawniejszych prac opierała się na badaniach biologicznych. W metodzie tej trudno wykluczyć zakażenie się zwierzęcia z innego źródła. Prace Sergenta (1928), Sanarelliego i Alessandriego (1932, 1933) i Kiedrowskiego (1935), z polskich zaś autorów Panka (1933), Panka i Zacharowa (1928), Fejgin (1933) i Karwackiego (1933) wskazują na istnienie ziarnistych, przesączalnych i niekwasoopornych form prątków.

Panek (1933) uzyskał w przesączach formy ziarniste, które z węglowodanów tworzyły kwas mlekowy. Na podłożu Besredki następowała rewersja tych form do postaci normalnej (wg Kunickiego-Goldfingera 1954). Badania powtórne podjęte w celu potwierdzenia wyników Panka dały wynik negatywny (Piasecka-Zeyland i Zeyland 1933). Z prac Bisseta (1950) wynika, że fragmentacja u *Mycobacterium* jest zjawiskiem normalnym. Poszczególne człony prątka mogą być dostatecznie małe, żeby przejść przez filtr bakteryjny i tym można by tłumaczyć przesączalność prątków. Nie wyklucza to jednak istnienia „stadium przesączalnego" prątka zdolnego do rozmnażania i posiadającego cechy odmienne od postaci bakteryjnej.

Z nowszych prac należy wymienić doświadczenia Negre i Breteya (1952). Za pomocą odczynów tuberkulinowych wykazali oni własności alergizujące przesączów młodych hodowli. Po dożylnym wstrzyknięciu przesączów świnkom morskim i królikom znajdowano w wielu przypadkach prątki kwasooporne w płucach królików i węzłach chłonnych świnek morskich. Posiewy z tkanek i gruczołów szczepionych zwierząt nie dały wyników. Negre i Bretey uważają elementy przesączalne za młode postacie prątków.

Z opisanych tu doświadczeń nad przesączami hodowli prątków lub zawiesin roztartych tkanek nie można wyciągnąć całkiem pewnych wniosków. Wyniki, nawet pozytywne, nigdy nie były dostatecznie przekonywające. Zmiany chorobowe u szczepionych zwierząt były na ogół nieswoiste, przesącze zaś, przenoszone na podłoże sztuczne, w rzadkich jedynie wypadkach dawały wzrost, z reguły nietypowy dla prątków. Z przesączów uzyskiwano różnorodne organizmy: ziarniste i nitkowate, przypominające nitki niższych grzybów, niekwasooporne i często wytwarzające barwik.

Klieneberger-Nobel (1951) uważa, że stosunek między postacią bakteryjną prątków a ich cząstkami przesączalnymi można by

przyrównać do stosunku między formami *L* a postaciami bakteryjnymi *S. moniliformis*. W obu bowiem wypadkach nie udało się uzyskać hodowli z przesączów, jeśli szczep *L* nie był zaadaptowany. Adaptowane szczepy *L S. moniliformis* wyrastały zupełnie dobrze. Zdaniem Klieneberger-Nobel przesączalne formy prątków można by traktować jako formy *L*. Należy jednak liczyć się z tym, że postacie *L* prątków gruźlicy mogą się znacznie różnić od postaci bakteryjnej.

BADANIA MORFOLOGICZNE I PATOGENETYCZNE

Już obserwacje Mucha (1907, 1908) wykazały, że w gruzełkach płucnych przy perlicy bydlęcej trudno jest wykryć kwasooporne prątki. Mała jednak ilość pobranego materiału wywoływała gruźlicę u zwierząt doświadczalnych. Również minimalne ilości gruzełków gruźliczych wystarczały do uzyskiwania kultury prątków. Much dostrzegał w tkankach zakażonych zwierząt dwa rodzaje „*tuberculoses Virus*": a) prątki zawierające często ziarnistości i b) drobne, pojedyncze lub skupione w grona, ziarna niekwasooporne. W hodowlach laboratoryjnych ziarnistości przechodziły w postać drobnych pałeczek, te zaś w „dojrzałe prątki". Na 6 dzień hodowli stwierdzano już w hodowli prątki kwasooporne. Niekwasooporne, gramdodatnie ziarna oraz drobne pałeczki traktował Much jako formy przejściowe między ziarnami a typowymi prątkami. Jednym z ciekawszych doświadczeń Mucha było wysiewanie prątków gruźlicy na wyjałowione mleko, pochodzące od krów uodpornianych. Stwierdzał wtedy stopniowe przechodzenie prątków w postacie ziarenkowate. Po dodaniu do środowiska gliceryny ukazywały się znów kwasooporne prątki.

Hauduroy (1929) stwierdził, że w młodych płynnych hodowlach cienkie błonki zawierały zarówno kwasooporne, jak i niekwasooporne prątki, przy tym te drugie uważał za formy młode. Prątki wsiane do wody peptonowej rosły w postaci ziarnistego osadu. Osad ten zawierał strukturę podobną do mycelium. Obie te postacie, tzn. ziarnista i mycelialna, były niekwasooporne. Grasset (1935) zamrażał zawiesinę prątków kilkakrotnie w niskich temperaturach, a następnie odwirowywał ją. Płyn po odwirowaniu zawierał tylko niekwasooporne ziarenka. Przeszczepiając ten materiał co 2 - 3 dni, Grasset prowadził hodowle aż do 120 pasaży. W kulturach tych obserwowano wiele ziarn i niekwasoopornych młodych prątków; stopniowo jednak zwiększała się ilość prątków normalnych. Pleomorfizm u prątków obserwowany był przez wielu badaczy, m. in. przez Karwackiego (1925, 1926, 1933), który opisywał pojawiające się w hodowlach prątki niekwasooporne oraz formy ziarniste, przypominające drobne ziarniaki. Fitzgerald i Bernheim (1948), badając wpływ kwasu salicylowego na morfologię i zjadliwość prątków

gruźlicy, obserwowali zmiany kształtów, ale stosunkowo mało postaci ziarnistych. Również Pagel (1934), badając tkanki ze zmianami gruźliczymi, znajdował dużo ziarnistości. Mellon, Richardson i Fisher (1933) określali zmiany w morfologii prątka typu ptasiego jako cykl rozwojowy („life cycle"). Występowały tam również niekwasooporne postacie ziarniste i pałeczkowate. Podobne obserwacje opisali Melion i Fisher (1932), badając czyste hodowle saprofitów kwasoopornych. Lindegren i Mellon (1933) stawiali nawet hipotezę cyklu płciowego u *M. tuberculosis* — jako próbę wyjaśnienia zjawiska różnopostaciowości tych ustrojów zarówno w hodowlach sztucznych, jak i w tkankach zakażonych.

Niektórzy badacze jak Nedelkovitch (1936, 1950) i Wyckoff (1934) widzieli w ziarnistościach postać zdegenerowaną. Niekwasooporne i ziarniste formy prątków *M. tuberculosis* i *M. leprae* opisywała w ostatnich latach Aleksander-Jackson (1945, 1947). Stosowała ona specjalną technikę barwienia i badała materiał pobrany bezpośrednio od ludzi zakażonych gruźlicą i trądem. W przypadkach trądu stwierdzała ona zjawienie się zooglei bez typowych prątków. Niekiedy znajdowała w niebiesko zabarwionych zoogleach ziarna i kwasooporne pałeczki. Hauduroy i Tanner (1948) wyodrębnili poszczególne elementy morfotyczne prątków.

Doświadczenia te nie dają jednak wyników dostatecznie jasnych, ażeby można było bez zastrzeżeń przyjąć hipotezę cyklu rozwojowego u *Mycobacterium*.

Do zagadnienia cykliczności rozwoju i przesączalności u *Mycobacterium* wiele ciekawych obserwacji wniósł Morton i Kahn (1929, 1930, 1932), Kahn i Nonidez (1933, 1936) oraz Kahn i Torey (1928). Badali oni zmiany morfologiczne zachodzące w czasie rozwoju i hodowli prątków gruźlicy, wyprowadzanej z pojedynczej bakterii. Po 24 - 72 godzinach następował podział, w wyniku którego powstawały 3 lub 4 ciała owalne, dzielące się następnie na formy dwoinkowe. Drogą dalszych podziałów powstawały drobne ziarenka, układające się w zbitą masę. Ziarna i drobne pałeczki nie były kwasooporne. Opisany przez Kahna cykl rozwojowy prątka gruźlicy ma cechy wspólne z cyklem *L.* Z bakterii powstają ziarna dzielące się dalej w groniastych skupieniach, z tych powstają z powrotem prątki. Kahn i Nonidez (1933) badali poza tym przekroje kolonii *M. tuberculosis* dowodząc, że ziarnistości i niekwasooporne pałeczki stanowią młodą postać prątków.

Publikacje Kahna napotkały jednak krytykę ze strony innych autorów. Tak np. Gardner (1929) obserwował jedynie normalny podział, a Ørskov (1932, 1942, 1947) uważał formy ziarniste za produkty dezintegracji względnie krystalizacji z podłoża. Również Yegian

i Porter (1944) podkreślali możliwość powstawania artefaktów na skutek różnych manipulacji, szczególnie przy małym doświadczeniu i braku odpowiednich przyrządów. Wyckoff i Smithburn (1933) dostrzegli wprawdzie drobne cząstki ziarniste *M. phlei*, nie wykryli jednak cyklu rozwojowego. Autorzy zajmujący stanowisko krytyczne wobec doświadczeń Kahna nie brali jednak pod uwagę, że jedne organizmy przechodzą przez cykl *L* stosunkowo łatwo, inne zaś trudno i tylko w pewnych określonych warunkach. Badania sprawdzające ten proces muszą być przeprowadzane na identycznych szczepach i w tych samych warunkach. Zdaniem Klieneberger (1951) obserwacje Kahna są przekonywające i nie powinny być tłumaczone powstawaniem artefaktów w obrazach mikroskopowych.

Nieliczna grupa cytologów opisywała pewne elementy morfotyczne wewnątrz prątków jako mitochondria. Ciała ziarniste uważali oni za centra zawierające enzymy oksydo-redukcyjne. Ziarna te barwiły się charakterystycznie dla mitochondriów (Bassermann 1952, Knaysi, Hillier i Fabrikant 1950, Mudd i współpracownicy 1951).

Podziałem prątków gruźlicy typu ptasiego zajmowali się Bretey i Imelik (1949). Opisali oni prosty podział tych prątków i również przejście ich przez fazę ziarnistą. Na podstawie swych obserwacji wysuwają oni 3 możliwości reprodukcji prątków: 1) podział prosty, przy którym wszelkie inne postacie uważane są za resztki komórek lub artefakty, 2) cykl rozwojowy, gdzie postać ziarnista uważana jest za fazę rozwojową, 3) połączenie obu możliwości, zależnie od warunków wzrostu.

Zagadnienia reprodukcji i rozwoju prątków gruźlicy i *BCG* są ostatnio rozpatrywane: 1) od strony morfologicznej; studia przy pomocy mikroskopu fazowego (Rosenthal 1937) i elektronowego (Bretey i Imelik 1949, Reed i współpracownicy 1948, Rosenthal i Heagan 1955), 2) od strony patogenetycznej — przez badanie właściwości chorobotwórczych wyciągów z roztartych tkanek gruźliczych.

Wiele obserwacji, potwierdzających występowanie form ziarnistych jako ogniwa w cyklu reprodukcji prątków, wykonał Rosenthal i współpracownicy (1936, 1937, 1938, 1955). Ukazywanie poszczególnych faz wiąże się z warunkami, w jakich znajduje się zarazek. W kulturze laboratoryjnej faza ziarnista pojawia się wcześnie i trwa przez czas różny, zależnie od otoczenia. Zdjęcia w mikroskopie elektronowym wskazują, że ziarna wydostają się z prątków i rozwijają się poza nimi (Knaysi i współpracownicy 1950, Lembke 1947, Rosenthal 1938, Ruska i Lembke 1940, Werner 1951). Widoczne są przy tym resztki ciał bakterii. Po upływie około 7 dni pojawiają się znów dojrzałe postacie prątków (Fenner i Leach 1953, Kirschheimer i Youmans 1952, Youmans 1946). Nie można jednak twierdzić, że taki sposób

reprodukcji jest jedyny i że rozpad na elementy granularne musi zachodzić w każdej populacji (Werner 1951). Na ogół spotyka się w piśmiennictwie pogląd, że cykl rozwojowy zachodzi dopiero w warunkach niesprzyjających dla drobnoustroju. Takie warunki, zdaniem Klieneberger, mogły zaistnieć np. w kapilarach Kahna (Kahn 1929, 1930, Kahn i Nonidez 1936).

Stosowane dotychczas metody badawcze pozwalają na poznanie kształtu i wielkości ziarnistości prątków (Lembke 1947, Youmans 1946), nie jest znana natomiast ich natura, którą różni badacze próbują różnie wyjaśnić (ciała chromatynowe, jądra, mitochondria) (Mudd i współpracownicy 1951, Winterscheid i Mudd 1953). Zdaniem Rosenthala i współpracowników, występowanie cyklu wzrostowego u prątków gruźlicy pozwala przypuścić, że poszczególne fazy zarazka mogą różnie wpływać na reakcję zakażonego ustroju oraz na rozsiew zarazka w gospodarzu. Po doskórnej iniekcji *BCG* ziarniste i niekwasooporne formy ukazują się w tkankach dosyć wcześnie (Rosenthal 1937). Świnki morskie szczepiono emulsją organów wewnętrznych ze świnek szczepionych uprzednio *BCG*. Z emulsji takich nie udawało się wyhodować prątków. Z organów zwierząt szczepionych emulsją uzyskano jednak kultury (Rosenthal 1937, 1938). Rosenthal uważa, że mogło to być spowodowane albo obecnością niewielu prątków, albo wynikiem dojrzewania ziarn. Rosenthal jest zwolennikiem tej drugiej hipotezy.

Przesącze młodych kultur (20-72 godzin), badane w mikroskopie elektronowym, nie wykazały ziarn tej wielkości jak w kulturach starych. Posiewy filtratów z hodowli młodych były zawsze jałowe. Niekiedy tylko wykrywano ciała wielkości rzędu wirusów lub bakteriofagów (50-110mμ). Takie ciała wykrywali Rosenthal i Heagan (1955), badając cykl rozwojowy szczepów *BCG*. W młodych kulturach tych szczepów (44 godz.) obserwowali oni ciałka kuliste otaczające prątki. Ciekawy jest fakt, że przesącze młodych hodowli *BCG* hamowały rozwój prątków, lecz nie wywoływały lizy; nie były to więc bakteriofagi, tym bardziej że nie namnażały się przez kolejne pasażowanie.

W badaniach organów zwierząt zakażonych często znajduje się niewiele prątków gruźlicy, mimo daleko posuniętych zmian gruźliczych. Usiłując tłumaczyć to zjawisko Lurie (wg Briegera 1949) uważa, że wskutek alergii zakłóceniu ulega symbioza między komórką gospodarza i pochłoniętym zarazkiem. Komórka gospodarza albo substancje powstające na skutek alergii zabijają prątki, uwalniając ich toksynę i prowadząc do ciężkich uszkodzeń tkanki. Ten sam pogląd wyraża Thomas (wg Briegera 1949), który wykazał dwufazowość infekcji gruźliczej. Według Thomasa, w pierwszej fazie zakażenia dochodzi do proliferacji komórek nabłonkowatych, w drugiej zaś fazie pojawiają się

substancje, które zabijają zarazki lub hamują ich rozwój. Nie wszyscy jednak badacze podzielają to stanowisko. Nie jest wykluczone, że występowanie niedużej ilości prątków w ogniskach gruźliczych może być wynikiem niedoskonałości używanych metod badawczych, przy pomocy których nie udaje się wykryć zmienionych postaci prątków, może nawet zdolnych do namnażania.

Ciekawych obserwacji dokonał Toeppich (1927). Wykazał on, że komórki nabłonkowe kanalików płucnych pochłaniają prątki prawie natychmiast po zakażeniu. Prątki najpierw mają kształt krótkich ziarnistych pałeczek kwasoopornych. Po kilku dniach następuje znaczne zmniejszenie ilości zarazków, a komórki nabłonkowe nadmiernie się powiększają. Po pewnym czasie wzrasta ilość kwasoopornych pałeczek w formie nitkowatej, które wydają się tworzyć nową generację.

Brieger i współpracownicy (1944, 1951, 1953, 1954) wprowadzali prątki królikom do śledziony. Część królików po zakażeniu dośledzionowym zabijano i fragmenty śledziony hodowano *in vitro*. Po pewnym czasie zabijano pozostałe króliki i badano stopień zmian gruźliczych w tkance hodowanej *in vitro* i *in vivo*. W śledzionie hodowanej poza organizmem prątki ukazywały się natychmiast po iniekcji, rozmnażając się gwałtownie i przenikając w ciągu 10 dni do całej tkanki. Po 15 dniach powstały widoczne mikrokolonie. W śledzionie *in vivo* widziano po 9 dniach zwykłe ogniska martwicze i gruzełki z bardzo nieznaczną ilością prątków. Po 16 dniach hodowli *in vivo* uzyskiwano ten sam obraz. Zmiany makroskopowe w tkance stawały się coraz rozleglejsze. Taka gruźlicza tkanka przeniesiona do hodowli laboratoryjnej (*in vitro*) pokrywała się po 6 dniach mikrokoloniami. Uderzające było gwałtowne namnażanie się prątków. Już po 3 dniach ukazały się gruzełki, zawierające wydłużone lub nitkowate prątki o mniejszej kwasooporności. Po 6 dniach bakteryjne nitki dawały stopniowo kwasooporne kolonie. Brieger i współpracownicy (1952, 1953) zastosowali nową i obiecującą technikę. Różnice między doświadczeniami *in vivo* i *in vitro*, robionymi na królikach, skłoniły ich do wniosku, że warunki bytowania zarazków w organiznie i w hodowlach tkankowych nie są jednakowe. Autor uważa, że w tych różnych środowiskach zarazek gruźlicy musi występować w różnych postaciach. Aby wykazać rewersję „niewidzialnych ziaren" w postać bakteryjną, Brieger dokonywał bezpośrednich obserwacji kropli płynu owodniowego z zarodków kurzych. Prątki gruźlicy wszczepiano do płynu owodniowego 9-dniowego zarodka kurzego. Po 3 dniach wylęgania znajdowano niewiele prątków w płynie owodniowym. Płyn ten wraz z błoną wyjmowano i wsiewano do podłoża Kirchnera. Po kilku dniach w hodowli sztucznej uzyskano masę prątków. Początkowo trudno było w preparatach z mikrohodowli znaleźć kwasooporne prątki, widoczne były jedynie

szczególnego rodzaju ogniska i jakaś niezorganizowana substancja, wykazująca jednak pewną strukturę. Po niewielu dniach hodowli *in vitro*, w substancji tej występowała pewna ilość bardzo małych elementów o postaci kulistej lub mikropałeczek (microrods), często opisywanych jako ziarnistości. Wkrótce całe ognisko było pełne tych elementów, początkowo niekwasoopornych, lecz gramdodatnich, barwiących się na niebiesko zmodyfikowaną metodą Giemzy. Na trzeci dzień inkubacji przeważały w materiale drobne bladoniebieskie mikropałeczki, a z ziarnistych ognisk wyrastały długie, rozgałęzione nici.

K l i e n e b e r g e r - N o b e l (1951), omawiając te doświadczenia, uważa, że cykl rozwojowy u *Mycobacterium* jest w dalszym ciągu niewyjaśniony. Mimo że dotychczasowe informacje są niekompletne, można jednak przypuścić, że prątek gruźlicy przechodzi przez jakieś fazy, zawierające postać granularną. Stawia to go w rzędzie organizmów, które przechodzą przez cykl *L*. Możliwe, że zachodzi tu również proces regeneracji prątka z drobnych elementów niekomórkowych. B r i e g e r (1951), zajmując się w dalszym ciągu niekomórkowymi postaciami prątka gruźlicy, wysuwa przypuszczenie, że w tkankach zwierzęcia zakażonego i wrażliwego na zakażenie, zarazek przechodzi w postać niedostrzegalną w mikroskopie przy zwykłym powiększeniu, postać niekomórkową, ale zjadliwą oraz zdolną w odpowiednich warunkach do powrotu do postaci bakteryjnej.

B r i e g e r i współpracownicy (1949, 1951) starali się wykazać, że badanie wyciągów z tkanek zakażonych zwierząt jest najwłaściwszą metodą stwierdzenia obecności elementów ziarnistych pochodzenia bakteryjnego. Zakażali oni dożylnie króliki prątkiem typu bydlęcego i w różnych odstępach czasu wypreparowywali śledzionę. Z roztartych tkanek robili wyciągi i wirowali w celu całkowitego usunięcia bakterii. Klarowne filtraty kontrolowano mikroskopowo w celu sprawdzenia nieobecności bakteryjnej postaci prątka. Płyny te posiewano na różne podłoża, nie uzyskując jednak wzrostu mimo długiego okresu hodowli (2 miesiące). Małe ilości badanego płynu, wstrzyknięte podskórnie śwince morskiej, wywołały abscesy gruczołowe w ciągu 4-6 tygodni. W wydzielinie ropnej znaleziono duże ilości kwasoopornych prątków, a w śledzionie wykazano zmiany gruźlicze. Zjadliwy wyciąg poddano badaniom pod mikroskopem elektronowym. Otrzymano na zdjęciach 2 typy cząstek: 1) cząstki wielkości około 0,5 mikrona lub większe, 2) cząstki małe i okrągłe o średnicy około 0,2 mikrona. Cząstki większe były zbliżone do elementów bakteryjnych. Niektóre z nich posiadały strukturę, którą można podejrzewać, że jest złożona z wielu zbitych razem mikropałeczek. Inne posiadały palczaste wypustki przypominające pośrednie stadia między formą ziarnistą a pałeczkowatą. Cząstki drobniejsze przypominały mniejsze wirusy zwierzęce. Nie stwierdzono ich obecności w preparatach kontrolnych z tkanek

zdrowych. Nie jest jednak wykluczone, zdaniem autorów, że mogą to być struktury wydzielane przez komórki w warunkach patologicznych. Badane wyciągi autorzy filtrowali przez błony gradokolowe o średniej wielkości por 0,725 mikrona. Filtrat taki nie wywołał wyraźnych zmian u świnek morskich. Autorzy przyznają sami, że wyniki tych doświadczeń należy interpretować z pewną rezerwą. Wysuwają jednak przypuszczenie, że infekcja może być wywołana cząstkami pochodzenia bakteryjnego, które są za duże, aby przejść przez filtr, lecz nie są jeszcze normalnymi pałeczkami. Możliwe, że tego rodzaju cząstki obserwował i opisywał Much. Z drugiej strony, cząstki mniejsze, przechodzące przez filtr, mogą być niezdolne do wywołania zakażenia przy nieobecności ciał większych. Ujemne wyniki posiewów z wyciągów tkankowych bezpośrednio na podłoża laboratoryjne można wytłumaczyć większymi wymaganiami wzrostowymi pewnych postaci prątków, rosnących tylko w obecności komorek gospodarza. Ten sam wyciąg jednak wstrzyknięty do normalnej śledziony królika, inkubowanej *in vitro*, wykazał silne namnożenie bakterii po 2 tygodniach inkubacji.

Pogląd Lurie, według którego skąpa ilość prątków w tkankach gruźliczych powodowana jest zniszczeniem większości bakterii na drodze alergicznej, jest trudny do przyjęcia (B r i e g e r 1949). Brieger poddaje też krytyce dotychczasowy pogląd wielu autorów na wzajemny stosunek mikroorganizmu i gospodarza. Autorzy ci (np. Lurie) uważają gruzełki gruźlicze za pole walki między komórką gospodarza i prątkiem. Gruzełki gruźlicze należałoby uważać nie za pole walki, lecz za miejsce współrozwoju, gdzie prątki mogą rozwijać się lub nie, zależnie od warunków otoczenia i od indywidualnego stanu gospodarza.

Mimo wielu jeszcze luk w opisanych wyżej obserwacjach, wydaje się możliwe do przyjęcia, że prątek gruźlicy może przechodzić przez pewien cykl, obejmujący fazę ziarnistą. Poznanie oraz wyjaśnienie istoty cyklu rozwojowego prątków oraz jego fazy ziarnistej może mieć poważne znaczenie dla studiów nad procesem zakażenia gruźliczego.

LITERATURA

A l e k s a n d e r - J a c k s o n E., 1945: *Science*, **101** : 563.
A l e k s a n d e r - J a c k s o n E., 1947: *J. Bact.*, **54** : 64.
A r l o i n g F., D u f o u r t A., 1925: *C. r. Soc. Biol.*, **93** : 165.
B a s s e r m a n n F. J., 1952: *Zentr. Bakter. I.* **158** : 104.
B e z a n ç o n F., P h i l i b e r t A., 1926: *Med. Paris*, **34** : 33.
B i s s e t K. A., 1948a: *J. Hyg.*, **46** : 173.
B i s s e t K. A., 1948b: *J. gen. Microbiol.*, **2** : 83.
B i s s e t K. A., 1950: The cytology and life-history of bacteria. Livingstone, Edinburgh.

Bisset K. A., 1951a: *J. gen. Microbiol.*, **5** : 150.
Bisset K. A., 1951b: *Ann. Rev. Microbiol.*, **5** : 1.
Bisset K. A., 1952: *J. gen. Microbiol.*, **7** : 233.
Bretey J., Imelik S., 1949: *Ann. Inst. Pasteur*, **77** : 228.
Brieger E. M., 1944: *J. Path. Bact.*, **57** : 282.
Brieger E. M., Cosslet V. E., 1949: *Nature*, **164** : 352.
Brieger E. M., 1949: *Tubercle*, **30** : 227, **36** : 242.
Brieger E. M., Fell H., Smith B., 1951: *J. Hyg. Camb.*, **49** : 189.
Brieger E. M., Miles A. R., Cosslet V. E., Horne W., 1951: *Nature*, **168** : 96.
Brieger E. M., Glauert A. M., 1952: *J. gen. Microbiol.*, **7** : 287.
Brieger E. M., Cosslet V. E., Glauert A. M., 1953: *Nature*, **171** : 211.
Brieger E. M., Glauert A. M., 1953: *Tubercle*, **34** : 5.
Brieger E. M., Glauert A. M., 1954: *Tubercle*, **35** : 80.
Calmette A., Valtis, J., 1930: *Ann. Inst. Pasteur*, **44** : 629.
Calmette A., Valtis J., Lacomme M., 1926: *Presse Médic.*, **34** : 1409.
Cooper F. B., Petroff S. A., 1928: *J. inf. Dis.*, **43** : 200.
Dawson M. H., Hobby G. L., 1939: Third Int. Congr. Microbiol. Abstr., **177** : 78.
Dienes L., 1938: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **39** : 365.
Dienes L., 1939: *J. inf. Dis.*, **65** : 24.
Dienes L., 1939: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **42** : 636.
Dienes L., 1939: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **42** : 77.
Dienes L., 1942: *J. Bact.*, **44** : 37.
Dienes L., 1943: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **53** : 84.
Dienes L., 1944: *J. Bact.*, **48** : 125.
Dienes L., 1946: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **11** : 51.
Dienes L., 1947: *J. Bact.*, **54** : 231.
Dienes L., 1947: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **64** : 166.
Dienes L., 1948: *J. Bact.*, **56** : 445.
Dienes L., 1948: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **68** : 589.
Dienes L., 1949: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71** : 30.
Dienes L., 1950: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **75** : 412.
Dienes L., Smith W. E., 1942: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **51** : 297.
Dienes L., Weinberger H. J., Madoff S., 1950: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **75** : 409.
Dienes L., 1950: *J. Bact.*, **59** : 755.
Dienes L., Weinberger J. H., 1951: *Bact. Rev.*, **15** : 245.
Durand H., Charchanski, 1925: *C. r. Soc. Biol.*, **93** : 499.
Durand H., Vaudremer A., 1924: *C. r. Soc. Biol.*, **90** : 916.
Fejgin B., 1933: *Med. Dośw. Społ.*, **17** : 262.
Fell H. B., Brieger E. M., 1951: *J. Hyg. (Camb.)*, **49** : 181.
Fenner F., Leach R. H., 1953: *Am. Rev. Tuberc.*, **68** : 321.
Fitzgerald R. J., Bernheim F., 1948: *Am. Rev. Tuberc.*, **58** : 210.
Fontes A., 1910: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **2** : 141.
Gardner A. D., 1929: *J. Path. Bact.*, **32** : 715.
Gloyne S. R., Glover R. E., Griffith A. S., 1929: *J. Path. Bact.*, **32** : 775.
Grasset E., 1935: *C. r. Soc. Biol.*, **119** : 261.
Hauduroy P., Vaudremer A., 1923: *C. r. Soc. Biol.*, **89** : 1276.
Hauduroy P., Les microbes filtrants visibles. Masson, Paris.

Hauduroy P., 1946: Etude bactériologique. Le problème des Tuberculoses atypiques. Masson, Paris.
Hauduroy P., Tanner F., 1948: *C. r. Soc. Biol.*, **142** : 1510.
Heilman F. R., 1941: *J. inf. Dis.*, **69** : 32.
Imelik S., Bretey J., 1949: *Ann. Inst. Pasteur*, **77** : 597.
Imszeniecki A. A., Sołncewa L. I., 1954: *Mikrobiołogija*, **23** : 27.
Kahn M. C., 1929: *Am. Rev. Tuberc.*, **20** : 150.
Kahn M. C., 1930: *Tubercle*, **11** : 202.
Kahn M. C., 1932: *Zentr. Bakter. I. O.* **125** : 456.
Kahn M. C., Nonidez F. J., 1933: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **30** : 577.
Kahn M. C., Torey J. C., 1928: *Am. Rev. Tuberc.*, **18** : 850.
Kahn M. C., Nonidez F. F., 1936: *Am. Rev. Tuberc.*, **34** : 361.
Karwacki L., 1925: *C. r. Soc. Biol.*, **92** : 374.
Karwacki L., 1925: *C. r. Soc. Biol.*, **92** : 801.
Karwacki L., 1926: *C. r. Soc. Biol.*, **95** : 403.
Karwacki L., 1933: *Med. Dośw. Społ.*, **17** : 230.
Kiedrowski W., 1935: *Arch. Patoł. Anat. Fizjoł.*, **1** : 13.
Kiedrowski W., 1951: *Usp. Sowr. Biol.*, **31** : 38.
Kirschheimer W. F., Youmans G. P., 1952: *Am. Rev. Tuberc.*, **66** : 486.
Klieneberger E., 1935: *J. Path. Bact.*, **40** : 93.
Klieneberger E., 1936: *J. Path. Bact.*, **40** : 587.
Klieneberger E., 1938: *J. Hyg.*, **38** : 458.
Klieneberger E., 1942: *J. Hyg.*, **42** : 485.
Klieneberger-Nobel E., 1949: *J. gen. Microbiol.*, **3** : 434.
Klieneberger-Nobel E., 1949: *J. Hyg.*, **47** : 393.
Klieneberger-Nobel E., 1951: *Bact. Rev.*, **15** : 77.
Knaysi G., Hillier J., Fabricant C., 1950: *J. Bact.*, **60** : 423.
Kriwiski A. S., 1952: *Mikrobiołogija*, **21** : 596.
Kunicki-Goldfinger W., 1954: *Acta Microbiol. Polon.*, **3** : 199.
Kuprejczuk M. A., 1953: *Mikrobiołogija*, **22** : 535.
Lembke A., 1947: *Zentr. Bakter. I. O.*, **152** : 239.
Lindegren C. C., Mellon R. R., 1933: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **30** : 110.
Malassez L. W., Vignal, 1883: *Arch. Physiol. Norm. Path.*, **2** : 369.
Mellon R., Fisher L., 1932: *J. inf. Dis.*, **51** : 117.
Mellon R., Richardson R., Fisher L., 1933: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **30** : 80.
Morin H., Valtis J., 1926: *C. r. Soc. Biol.*, **94** : 39.
Much H., 1907: *Beitr. Z. klin. Tuberk.*, **8** : 85.
Much H., 1908: *Berl. Med. Wochenschr.*, **1** : 691.
Mudd S., Winterscheid L. C., de Lamater E. D., Henderson H. J., 1951: *J. Bact.*, **62** : 459.
Nedelkowitch J., 1936: *Ann. Inst. Pasteur*, **57** : 171.
Nedelkovitch J., 1950: *Ann. Inst. Pasteur*, **78** : 177.
Ørskov J., 1932: *Zentr. Bakter. I. O.*, **123** : 271.
Ørskov J., 1942: *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **19** : 575.
Ørskov J., 1947: *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **24** : 198.
Pagel W., 1934: *J. Path. Bact.*, **39** : 689.
Panek K., Zacharow 1928: wg Panek 1933.
Panek K., 1933: *Med. Dośw. Społ.*, **17** : 254.
Piasecka-Zeyland E., Zeyland J., 1933a: *Med. Dośw. Społ.*, **17** : 261.

Piasecka-Zeyland E., Zeyland J., 1933b: *Gruźlica*, **8** : 321.
Pinner M., Voldrich M., 1931: *Am. Rev. Tuberc.*, **24** : 73.
Plotz H., 1934: *C. r. Acad. Sci.*, **199** : 328.
Potter F., 1924: *C. r. Soc. Biol.*, **91** : 922.
Reed C. I., Rosenthal S. R., Reed B. P., 1948: *Ann. Inst. Pasteur*, **75** . 504.
Rosenthal S. R., 1936: *Arch. Pathol.*, **22** : 348.
Rosenthal S. R., 1937: *Am. J. Dis. Child.*, **54** : 296.
Rosenthal S. R., Heagan B., 1955: *Ann. Inst. Pasteur*, **88** : 479.
Rosenthal S. R., Heagan B., 1955: *Ann. Inst. Pasteur*, **88** : 591.
Ruska H., Lembke A., Christophersen, 1940: *Klin. Wchschr.*, **19** : 217.
Sanarelli S., Alessandrini A., 1933: *Ann. Inst. Pasteur*, **50** : 167.
Sanarelli S., Alessandrini A., 1932: *Ann. Igiene*, **42** : 129.
Sergent E., Durand H., Bende R., 1928: *C. r. Soc. Biol.*, **99** : 28.
Smith W., 1941: *J. Path. Bact.*, **53** : 29.
Sołncewa L. I., 1953: *Mikrobiołogija*, **22** : 652.
Sołtys M., Taylor A., 1944: *J. Path. Bact.*, **56** : 173.
Valtis J., 1924: *C. r. Soc. Biol.*, **90** : 19.
Vaudremer A., 1923: *C. r. Soc. Biol.*, **89** : 80.
Vera H., Rettger L., 1940: *J. Bact.*, **39** : 659.
Walker E. L., Sweeney M. A., 1934: *J. inf. Dis.*, **54** : 182.
Werner G. H., 1951: Electron microscopic studies of the cellular morphology of the tubercle bacillus in tuberculosis research. Karger ed., Bâle.
Wintersheid L. C., Mudd S., 1953: *Am. Rev. Tuberc.*, **67** : 59.
Wyckoff R. W. S., Smithburn K. C., 1933: *J. inf. Dis.*, **53** : 201.
Wyckoff R. W. S., 1934: *Am Rev. Tuberc.*, **24** : 93.
Yegian D., Porter K., 1944: *J. Bact.*, **48** : 83.
Youmans G. P., 1946: *J. Bact.*, **51** : 703.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9: 253—260

Z. Kwiatkowski

RADIATION ACTION ON THE MITOTIC CROSSING-OVER IN *ASPERGILLUS NIDULANS*

from the Department of Microbiology, The University, Wrocław and the Department of Microbial Genetics, L. Hirszfeld Institute of Immunology and Exp. Therap., Wrocław

Received 2 Mai 1960

INTRODUCTION

Mitotic segregation in *A. nidulans* gives an origin to two kinds of products, haploids and diploid segregants. The later are arising via mitotic crossing-over (Pontecorvo *et al. 1953*, Pontecorvo and Käfer 1958). Simmilar processes of segregation were also found in *A. niger* (Pontecorvo *et al.* 1953), *Penicillium* (Pontecorvo and Sermonti 1954) and *Fusarium* (Buxton 1956).

The incidence of crossing-over in *A. nidulans* for the tested markers is small. The haploid segregants are also very rare. This is why markers suitable for selection of segregants have to be used. Several types of selection of segregants have been used in analysis of mitotic crossing-over and haploidization.

Recently it was found in *Penicillium* that conidia treated with nitrogen mustard (Sermonti and Morpurgo 1959) formed the colonies with visible sectors (yellow or white). According to Sermonti and Morpurgo (1959) an increased rate of somatic segregation seems to be responsible for the originating sectors. Similar effect was also produced in *A. nidulans* after adding to the medium some chemical mutagens (Pontecorvo, personal communication).

The purpose of present work was to study the effect of ultraviolet radiation, γ and X rays on the appearance of segregant colour type of conidia in diploid strains of *A. nidulans*.

In this research the selection for visible characters was applied. Yellow and white segregants originating as single heads or small spots

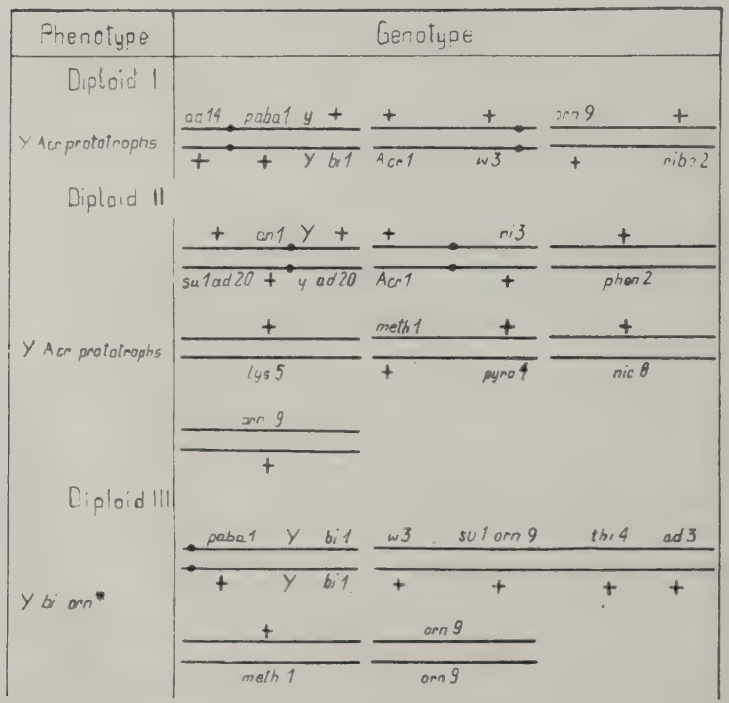
among the wild type conidia (green) were easily detectable under the dissecting microscope. It was stated that ultraviolet and γ rays increased the frequency of appearance of differently pigmented (yellow and white) heads of conidia. The well marked diploid strains were used in the experiments. It was expected to obtain in this way some insight in the changes responsible for the high frequency of occurrence of yellow and white heads of conidia among the wild type (green), after the irradiation.

METHODS

Most of the haploid strains of *A. nidulans* were kindly supplied by Professor G. Pontecorvo. The Taster Strain *A* (F o r b e s, 1959) was kindly given by E. Forbes from Genetics Department, the University of Glasgow.

Table I

Phenotypes and Genotypes of Original Diploids



* *su 1 orn 9* is semirecessive

For general techniques see Pontecorvo *et al.* (1953). Diploids were synthesized by Roper's method (Roper, 1952). The techniques of mitotic analysis are described by Pontecorvo and Käfer (1958). Table I gives a list of the diploids being under the investigation.

As a source of ultraviolet Hanau lampe in the 254mμ region was employed. The conidia were irradiated with single dose giving 10% of survivals. The time of treatment was 45 seconds. In some experiments instead of conidia colonies grown for 12 hours on complete medium were irradiated for 6 minutes. The colonies were grown under the cover glass which was removed before the treatment. The purpose of using the cover glass was to obtain thin and flat colonies suitable for irradiation. When ionizing radiations were applied 12 hours old colonies on complete medium were irradiated. Single doses of *X* rays: 500 r and 1000 r were used. Much higher doses were applied when γ rays were used in the experiments. As a source of γ rays needles containing radium were applied. The total calculated dose was 5000 r. During the irradiation, which lasted for 6 days, constant temperature was kept at 18°C. After this time the dishes were put for two days into an incubator.

Symbols of mutant alleles: chromosome I: *an 1*, *paba 1*, *ad 20*, *bi 1*, chromosome II: *thi 4*, *ni 3*, *ad 3*, chromosome III: *phen 2*, chromosome IV: *meth 1*, *pyro 4*, chromosome V: *lys 5*, chromosome VII: *nic 8*, chromosome VIII: *orn 9*, *ribo 2* — aneurine, PABA, adenine, biotine, thiazole, nitrite, adenine, phenylalanine, methionine, pyridoxin, lysine, nicotinic acid, ornithine, riboflavine requirement. *su 1 ad 20*: supressor of *ad 20*, *y*: yellow colour,*Y*: green colour (wild type), *Acr 1*: acriflavine resistance (semidominant), *w 3*: white coloured conidia.

After the ultraviolet irradiation of diploid mycelium the number of segregant type of conidia (yellow and white in diploid I, yellow in diploid II and white in diploid III) was markedly increased in comparision with not treated mycelium.

When instead of mycelium diploid conidia in the suspension were irradiated and then plated, the increase was not so evident. In this case there was some fraction of colonies with visible coloured sectors but the number of single heads containing the conidia of segregant type of color was almost the same as in control.

It was not possible to estimate exactly the rate of increase of production of yellow and white conidia among the wild type (green). It appeared that the best method giving at least some approximate measure of the increase was direct counting of the spots and single conidial heads differently coloured. The results are given in table II.

Table II

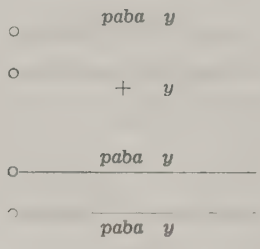
Frenquency of White and Yellow Heads after Irradiation (UV) of Mycelium

Diploid I	Control: Diploid II		Diploid III
Total (no. of heads)	100000	100000	100000
Number of differently coloured conidia	2 *y* 20 *w*	1 *y*	1 *w*
	after irradiation		
Diploid I	Diploid II		Diploid III
Total (no. of heads)	100000	100000	100000
Number of differently coloured heads	200 *y* 300 *w*	70 *y*	200 *w*

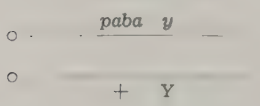
Segregants were selected and isolated from the treated colonies. In order to avoid repeated isolation of the same segregant clone only one segregant was picked out from each diploid colony. The segregants were tested to establish their genotype. The results are given in Table III.

It was then ascertained that mitotic crossing-over was responsible for the apearance of high number of segregant colour type of conidia, Only in one case after UV treatment this phenomenon was due to haploidization.

In diploid I crossing-over between the centromere and yellow should give two detectable types of segregants:



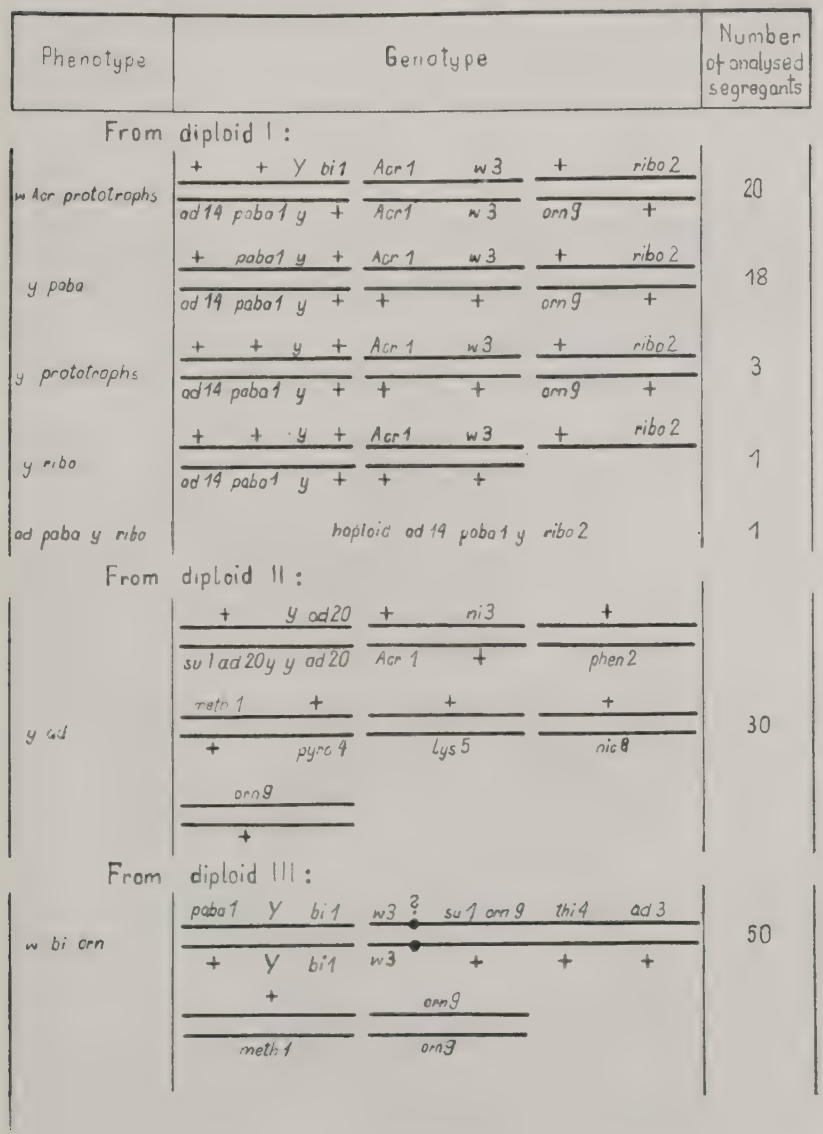
The wild type was:



Both types of segregants were found. There were 18 segregants of the second type and only 3 of the first one. In the second arm of

Table III

Phenotypes and Genotypes of Colour Segregants after UV-treatment


Phenotype
Genotype
Number of analysed segregants
From diploid I :
w Acr prototrophs
+ + Y bi1 / ad14 paba1 y +
Acr1 w3 / Acr1 w3
+ ribo2 / orn9 +
20
y paba
+ paba1 y + / ad14 paba1 y +
Acr1 w3 / + +
+ ribo2 / orn9 +
18
y prototrophs
+ + y + / ad14 paba1 y +
Acr1 w3 / + +
+ ribo2 / orn9 +
3
y ribo
+ + y + / ad14 paba1 y +
Acr1 w3 / + +
+ ribo2
1
ad paba y ribo
haploid ad14 paba1 y ribo2
1
From diploid II :
y ad
+ y ad20 / su1 ad20y y ad20
+ ni3 / Acr1 +
+ / phen2
meth1 + / + pyro4
+ / lys5
+ / nic8
orn9 / +
30
From diploid III :
w bi orn
paba1 Y bi1 / + Y bi1
w3 ? su1 orn9 thi4 ad3 / w3 + + +
+ / meth1
orn9 / orn9
50

chromosome 1 and in the other chromosomes the diploid was still heterozygous for the tested markers. There was one yellow segregant which probably was of nondisjunctional origin. It required riboflavine.

Among white segregants (in diploid I) there should be only one type of diploid segregants, namely:

$$\frac{Acr \quad w}{\qquad}$$

$$\frac{Acr \quad w}{\qquad}$$

There were 20 white segregants examined and all of them were of the above mentioned type. The analysed white diploids were still heterozygous for the other markers. Among the classified segregants in diploid I only one out of 43 was haploid.

When diploid 1 was treated with γ rays simmilar increase of segregation frequency was shown to take place. The results are given in Table IV.

Table IV

Phenotypes and Genotypes of Colour Segregants after γ Rays Irradiation

Phenotype	Genotype	Number of analysed segregants
From diploid 1 :		
w Acr prototrophs	+ y bi1 / ad14 paba1 y + ; Acr1 w3 / Acr1 w3 ; + ribo2 / orn9 +	12
y paba	+ paba1 y + / ad14 paba1 y + ; Acr1 w3 / + + ; + ribo2 / orn9 +	2
y prototrophs	+ + y + / ad14 paba1 y + ; Acr1 w3 / + + ; + ribo2 / orn9 +	17

No effect was observed after treating the diploid with low doses (500 and 1000 r) of X rays. Both other diploids (diploid II and III) were treated only with ultraviolet. In diploid II only one detectable kind of diploid segregants was expected, namely:

y ad

y ad

The wild type was:

y ad

Y +

In our experiments all classified yellow segregants were homozygous for *ad 20*. Diploid segregants were still heterozygous for other tested markers.

In diploid III the analysis of segregants was expected to give an information about the position of *su 1 orn 9*. It was known before that *su 1 orn 9* was localized at chromosome II and was linked with the centromere. If *su 1 orn 9* is on the same arm as *w*, some of white diploids should be homozygous for *su 1 orn 9*. If it is on the other arm none of the diploids could be homozygous *su 1 orn 9* unless double crossing-over in the same chromosome occurs. As we already know (P o n t e c o r v o and K ä f e r, 1958) coincidence of mitotic crossing-over in the two arms of one chromosome is rather uncommon. In our experiments 50 white segregants were analyzed. All were diploids and heterozygous for *su 1 orn 9*. It seems that *su 1 orn 9* is on the one arm, and *w* on the other. There is also a possibility that it is on the same arm but is so closely linked with centromere that no crossing-over between *su 1 orn 9* and centromere occurs.

In described experiments the mycelium was irradiated on the complete medium. In this condition the induced changes could be due to direct action of radiation on some cell constituent or to indirect effect via the medium. It was found that the irradiation of the medium alone both with ultraviolet and γ rays did not influence the frequency of segregation in colonies grown from conidia plated on this medium after treatment. It means that the increase in the incidence of segregation is due to the direct action of the radiations on the cells rather than via some changed constituents of the complete medium.

The work summarized here shows that in *A. nidulans* ultraviolet light and γ rays do increase the rate of somatic segregation by inducing mitotic crossing-over. It seems that the frequency of haploidization is not increased. The final effect of tested agents, one being non ionizing radiation and the other ionizing is the same.

It is worth noting, that the effects of both kinds of radiations are prolonged and are observed after the treatment is over. The increase

in the segregation rate was shown to occur even in the second transfer of previously irradiated mycelium. It seems that this semipermanent increase in the rate of mitotic crossing-over may be due to some genic or plasmagenic factor. Further investigations have to be done.

Acknowledgements. This work is part of a programme supported by the Polish Academy of Sciences, Committee of Microbiology.

For his guidance and advice my thanks are due to Professor W. Kunicki-Goldfinger, the Head of the Department of Microbiology, the University, Wrocław, Poland.

LITERATURE

Buxton, E. W., 1956: Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *J. gen. Microbiol* **15** : 133.

Forbes, E., 1959: Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, **13** : 67.

Morpurgo, G., Sermonti, G.: 1959: Chemically-induced instabilites in a heterozygous diploid of *Penicillium chrysogenum*. *Genetics*, **44** : 137.

Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemons, L. M., Macdonald, K. D., Bufton, A. W. J., 1953: The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, **5** : 142.

Pontecorvo, G., Sermonti, G., 1954: Parasexual recombination in *Penicillium chrysogenum*. *J. gen. Microbiol.*, **11** : 94.

Pontecorvo, G., Käfer G., 1958: Genetic analysis based on mitotic recombination. *Adv. Genet.*, **9** : 71.

Roper, J. A., 1952: Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, **8** : 14.

Sermonti, G., Morpurgo, G., 1959: Action of manganous chloride on induced somatic segregation in *Penicillium chrysogenum* diploids. *Genetics*, **44** : 437.

Z. Kwiatkowski

WPŁYW PROMIENIOWANIA NA MITOTYCZNE CROSSING-OVER U *ASPERGILLUS NIDULANS*

Streszczenie

Badaniu poddano 3 diploidalne szczepy *A. nidulans* (tab. I), określając częstość pojawiania się segregantów różniących się barwą konidii od szczepów wyjściowych.

Wykazano, że działanie ultrafioletu i promieni gamma zwiększa wielokrotnie pojawianie się takich segregantów (tab. II i III). Stwierdzono też, że segregacja ta jest z reguły wynikiem mitotycznego crossing-over.

Obserwowany efekt ultrafioletu jest długotrwały i daje się zauważyć nawet po przeniesieniu grzyba na nowe podłoże.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9: 261—267

M. Bedryńska-Dobek

DÉTERMINATION DES CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES CULTURAUX ET BIOCHIMIQUES, DU POUVOIR PATHOGÈNE ET DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DE 9 SOUCHES D'*ACTINOBACTERIUM* ET 2 D'*ACTINOMYCES BOVIS* APRÈS LA LYOPHILISATION

Institut Pasteur — Service des Anaérobies
Paris
Manuscrit reçu le 16 IX 1959

On a cru pendant très longtemps que le germe unique de l'actinomycose était. *A. israeli*. Les travaux réalisés à l'Institut Pasteur depuis 20 ans ont montré qu'il n'était pas seul et que d'autres espèces peuvent provoquer le même tableau clinique.

P r é v o t (1955) propose le nom d'actinobactériose pour la maladie provoquée par ces germes.

L'actinobactériose c'est une suppuration aiguë ou subaiguë passant rapidement chronique, à pus en grains risiformes blanc ou blanc jaunâtre suivant les microbes associés. On y observe tuméfactions dures, le plus souvent avec des fistules. Ces tuméfactions ont leur siège principalement dans la région cervico-faciale mais pouvant se généraliser à l'aine. Les métastases viscérales, pulmonaires et cérébrales aggravent encore le prognostic. Ce sont des maladies graves, longues, tenaces, accompagnées de douleurs locales et de trismus, à marche progressive cacchectisant et conduisant à la mort si elles ne sont pas soignées énergiquement.

Le diagnostic bactériologique et très difficile parce que:

1. La suppuration est toujours polymicrobienne gênant considérablement l'isolement des *Actinobactériums* qui poussent plus lentement que les microbes accompagnant.

L'addition d'azoture de sodium suivant la méthode de P r é v o t et T h o u v e n o t (1954) en empêche les aérobies et permet à un isolement plus rapide d'*Actinobactérium*.

2. La période d'adaptation aux milieux est parfois longue; on la raccourcit par addition de sérum. Il y a les espèces d'actinabactérium sérophiles toujours obligées les autres seulement au départ d'ensemencement.

3. La différenciation des espèces du genre *Actinobacterium* se fait avec la clef de détermination donnée par Prévot (1957) et Lebert et Tardieux (1952).

En faisant le stage à l'Institut Pasteur j'avais la possibilité d étudier 10 souches provenant de la collection du Service des Anaérobies après leurs lyophilisation. C'était 8 souches d'*Actinobactériums* aneérobies strictes et 2 souches *Actinomyces bovis* — anaérobies facultatives.

3 souches d'*Actinobactérium israeli: 1641 A, 1665 et 1997 myc.*
2 souches d'*A. abscessum: 1749 B* et *A 10*
1 souche d'*A. cellulitis: 1591 B*
1 souche d'*A. liquefaciens: 1784*
1 souche d'*A.meyeri: 1953*

pour comparaison 2 anaérobies facultatives:
2 souches d'*Actinomyces bovis: 854 A* et *1488.*

On a voulu étudier ces germes dans les mêmes conditions (temps, milieux, observations) aussi appercevant les modifications subies par les souches du fait de leur lyophilisation.

Les expériences, les observations, les résultats et les conclusions pour de groupe des germes sont exposés dans les tableaux suivants.

MORPHOLOGIE ET PHYSIOLOGIE (tableau I)

L étude morphologique montre qu'il s'agit d'*Actinomycetales* Gram-positives, pas d'acido-alcoolo résistantes qui se présentent comme bâtonnets immobiles, non sporulés, polymorphes, très souvent filamenteux, présentant des massues avec ramifications. Les massues sont situées soit aux extrémités, soit au point de bifurcation. Dimensions variables de 2 - 60×0,7 - 1 microns.

La catalase est négative pour toutes les souches sauf une — *Actinomyces bovis* qui montre un faible pouvoir catalasique.

Aérobiose, thermorésistance et longévité — voir le tableau I.

L'oxydoréduction: Vert-Janus, rouge-neutre, phéno-safranine ne sont pas réduits par aucune souche.

Tableau I

Physiologie

Souche	№	Anaerobiose		Termo-résistance (en 60°C)	Longévité (jours)
		facult.	strict.		
	1641-A		+	30 s	11
A. israeli	1665		+	60 s	10
	1597		+	60 s	16
A. abscessum	1749-B et 10-A		+	30 s	16
A. cellulitis	1581-B		+	60 s	18
A. liquefaciens	17-84		+	60 s	16
A. meyeri	1453		+	60 s	14
Ac. bovis	854-A et 14-88	+	—	60 s	30

CULTURES ET POUVOIR PROTÉOLITIQUE

Les cultures ne sont ni gazogènes (sauf *A. cellulits*) ni fétides, elles sont favorisées par le sérum.

En gélose profonde les colonies sont très souvent de petites tailles, irrégulieres, très cohérentes et non pigmentées.

En bouillons glucose: cultures en grumeaux blanchâtres ne troublant pas le milieu (*A. israeli, abscussum, A. cellulitis* et *Ac. bovis*), culture en petits grumeaux troublant peu le milieu (*A. liquéfaciens*) et culture en dépôt troublant le milieu (*A. meyeri*).

En général les gélatines ne sont pas liquéfiées par ces germes exception faite *A. liquéfaciens* qui après la lyophilisation a seulement faible pouvoir protéolitique qu'on peut constater dans 3 semaines.

Les *A. abscessum* et *A. liquéfaciens* coagulent le lait, les autres souches ne le modifient pas.

Les protéines coagulées (bouillon foie, fibre, serum coagulé et blanc d'oeuf coagulé) ne sont pas attaquées. On observe dans les bouillons V. F. glucosés + cervelle un depôt de culture très abondant. On croit que ce milieu est plus favorable que l' autre pour ces genre de germes.

GLUCIDES (tableau II)

Le galactose est fermenté par tous ces germes.

Il n'y a pas de grande différence entre l'utilisation de substances carbonées chez les *Actinobactérium*, exception faite la souche d'*A. meyeri* qui est moins active que l'autre.

Le *pH* des glucides fermentées sont variables suivant les souches d'*Actinobactérium*.

BIOCHIMIE

Le tableau III résume déterminations des caractères biochimiques effectuées avec 8 souches d'*Actinobactérium.*

La biochimie de souches étudiées a été effectuée avec la culture de 1000 ml bouillons. V. F. avec 1% glucose et 10 ml de sérum après 10 jours d'étuve.

Toutes les souches produisent du phénol, aucune ne produit de crésol. Deux souches donnent indol et scatol, 4 seulement des traces d'indol.

POUVOIR PATHOGÈNE

Le pouvoir pathogène a été étudié en innoculant une cobay par voie intramusculaire de suspension d'une souche ou d'*Actinobactérium* ou d'*Ac. bovis.* Chaque cobay a reçu: à la cuisse droite 1 cm^3 de culture en gélatine, à la cuisse gauche 1 cm^3 de culture en gélatine + 1 u. d'apertase. Entre 12 - 27 jours huit de ces animaux sont morts mais sans lésion caractéristique d'actinobactériose, chez 2 d'entre eux on n'a observé aucune trace de maladie. L'apertase qu'on a employé pour faciliter l'invasion de microbes (P a w e l a 1956) était probablement le facteur de la mortalité des animaux, mais alle n'avait aucune influence pour la formation de pus caractéristique avec les graines risiformes.

C'est très connu dans la littérature que l'obtention de lésion caractéristiques aux animaux d'expérimentation fait de très grandes difficultés (L e n t z e 1957, M a z u r e k 1954, P r é v o t 1955, R o s e b u r y, E p p s, C l a r k 1944, B r y g o o 1950).

TOXINES

Les productions de toxines par les souches étudiées, on les a effectuées sur les souris qui ont été inoculées dans la veine de la queue avec le surnageant des cultures de 48 h. centrifugées. Deux jours après l'inoculation les animaux étaient bien portants, sans aucune trace d'intoxication.

HÉMOLISINE

Les hémolisines beta ont donné 5 souches d'*Actinobactérium* en gélose au sang: *A. abscessum* (2) *A. israeli* (2) et *A. liquéfaciens* (1).

Uréase et lécitinase est négative pour toutes ses souches.

ANTIBIOGRAMME (tableau IV)

On a profité en faisant les antibiogrammes de méthode des disques Chabert standarisés à l'Institut Pasteur pour les anaérobies.

Tableau II

Utilisation (u) et *pH* après 3 semaines d'étuve substances carbonées

Souche	№	lactose		saccharose		arabinose		maltose		glycerol		galactose		glucose		lévulose	
		u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*
A. israeli	16-41 A	++	4	++	4	—	7	++	4	++	4	++	4	++	4	++	4
A. israeli	16-65 et 15-97	++	4	++	4	++	4	++	4	++	4	++	4	++	4	++	4
A. abscessus	17-49 B et 10-A	—	3	—	3	—	3	—	3	++	3	++	3	++	3	++	3
A. cellulitis	13-91 B	—	3	—	3	—	3	—	3	++	3	++	3	++	3	++	3
A. liquéfaciens	17-84	—	4	—	6	—	4	—	4	—	4	—	4	—	7	++	4
A. meyeri	14-53	+	6	—	7	—	7	+	6	++	4	++	4	++	4	—	7
Ac. bovis	854-A	+	6	++	4	++	4	++	4	—	7	++	4	—	7	++	4
Ac. bovis	14-88	++	3	++	3	++	3	++	3	—	7	++	3	++	3	++	3

Tableau III

Biochimie

Souche	№	Uréase	*pH* final	Acidité vol. tot. g/1000	Acid lactique	NH_3 g/1000	Acétoin	Amin. vol.	Aldehyd	Alcool	Aceton	Scatol	SH_2	Nitrate en nitrite
A. israeli	16-41	—	4	0,17	trace	0,24	—	trace	+	+	—	+	—	—
A. israeli	16-65	—	4	0,13	trace	0,24	—	+	+	+	+	—	—	—
A. israeli	15-97	—	4	0,17	traoe	0,24	—	+	+	+	+	—	—	—
A. abscessus	17-49 B	—	4	0.17	+	0.24	+	+	+	—	—	—	—	—
A. abscessus	10-A	—	3	0,38	+	0,20	+	+	+	—	—	—	—	—
A. cellulitis	13-91 B	—	4	0,15	trace	0,24	—	trace	+	+	+	—	—	+
A. liquéfaciens	17-84	—	4	0,24	+	0,24	—	—	+	+	+	—	—	—
A. meyeri	14-53	—	4	0,33	+	0,27	—	+	+	+	+	—	—	—
Ac. bovis	854-A	—	3	0,35	+	0,30	+	+	+	+	+	—	—	+/—
Ac. bovis	14-88	—	4	0,48	+	0,28	—	—	+	+	+	+	—	+

L'antibiotique le plus actif vis-à-vis des souches d'*Actinobactérium* est la penicilline, aucune souche n'a été trouvée penicillino-résistante.

Les souches d'*Actinobactérium* presque toutes sont insensibles à la streptomycine, la néomycine et la framycétine.

La sensibilité des *Actinobactériums* aux autres antibiotiques (auréomycine et tétracyline) est irrégulière. Aucune souche n'est sensible à tous les antibiotiques. Aucune souche n'est résistante à tous les antibiotiques. Donc en thérapeutique l'antibiogramme indiquera celui qui est préférable d'employer pour guérir le malade.

Tableau VI

Sensibilité aux antibiotiques, méthode disque

Souche	№	Penicilline	Streptomycine	Chloromycine	Bacytracine	Framycétine	Tetracycline	Auréomycine	Terramycine	Erytromycine	Spiramycine	Carbomycine	Néomycine
A. israeli	16-41 A	+	+/−	+/−	+/−	−	+	+	+/−	−	−	+	−
A. israeli	16-65	+/−	−	+	+	−	+	+	+/−	+	+	+	−
A. israeli	15-87	+	+/−	+/−	+	−	+	+	+/−	+	−	+	−
A. abscessus	17-49 B	+/−	−	+	+	−	+/−	+/−	+/−	+	+	+	−
A. abscessus	10-A	+/−	−	+	+	−	+/−	+	+/−	+	+	+	−
A. cellulitis	13-91 B	+	−	+	+	−	+/−	+	+	+	+	+	−
A. liquéfaciens	17-84	+	−	+	+	−	+/−	+/−	+/−	+	+	+	−
A. meyeri	14-53	+/−	−	+	+	−	+/−	+/−	+/−	−	−	−	−
Ac. bovis	854-A	+	+/−	+	+	−	−/+	−/+	−/+	+	+	+	−
Ac. bovis	14-88	+	−	+/−	−/+	−	+	+	−/+	+	+	+	+

BIBLIOGRAPHIE

Brygoo E. R., 1950: Abscence de pouvoir pathogène pour le singe des anaérobies du genre *Actinobactérium., Ann. Inst. Pasteur,* **78** : 698.

Lebert F., Tardieux P., 1952: Technique d'isolement et de détermination des bactéries anaérobies. *Coll. Trav. Pathol. Comp.,* ed. 2.

Lentze F., 1957: Versuche zur Übertragung der Actinomycose des Rindes auf kleine Versuchstiere. *Wiener Freiärzl. Wchnschr.*; 433.

Mazurek C., 1954: Nouvelles recherches sur la reproduction expérimentale. *Ann. Inst. Pasteur,* **87** : 345.

Pawela T., 1956: Możliwość zastosowania hyaluronidazy w stomatologii. *Czas. Stomatol.,* **5** : 251.

Prévot A. R., 1955: Actinobactériose humaine. *Fiches de Practique Médical.,* **4** : 1.

Prévot A. R., 1957: Manuel de classification et détermination des bactéries anaérobies., ed. **3** : 315.

Prévot A. R., Thouvenot S., 1954: Valeur de l'azide de sodium pour l'isolement des Anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur,* **86** : 236.

Rosebury T., Epps L., Clark A. R., 1944: A study of the isolation, cultivation and pathogenecity of *Actinomyces israeli* recovered from the human mouth and from actinomycosis in man. *J. inf. Dis.,* **74** : 131.

M. Bedryńska-Dobek

WŁAŚCIWOŚCI MORFOLOGICZNE, HODOWLANE, BIOCHEMICZNE, ZDOLNOŚCI CHOROBOTWÓRCZE ORAZ WRAŻLIWOŚĆ NA ANTYBIOTYKI 9 SZCZEPÓW *ACTINOBACTERIUM* ORAZ 2 *ACTINOMYCES BOVIS* PO LIOFILIZACJI

Streszczenie

Badano morfologię, biochemię, właściwości chorobotwórcze oraz wrażliwość na antybiotyki 8 szczepów z rodzaju *Actinobacterium* (*A. israeli* — 3, *A. abscessus* — 2, *A. cellulitis* — 1, *A. liquefaciens* — 1 i *A. meyeri* — 1) oraz 2 szczepów *Actinomyces bovis*. Z wyjątkiem 1 szczepu *A. israeli*, świeżo wyosobnionego przez autorkę z ropy od chorego wołu, reszta pochodziła ze zliofilizowanej kolekcji oddziału „Beztlenowców" Instytutu Pasteura.

Liofilizacja nie miała na ogół większego wpływu na zmianę właściwości biologicznych szczepów. Wyjątek stanowił szczep *A. liquefaciens*, który wykazał spóźnione i słabsze upłynnianie żelatyny, niż szczep świeżo izolowany. Liofilizacja jest więc odpowiednim środkiem do przechowywania tych trudnych do utrzymania przy życiu promieniowców chorobotwórczych.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9: 269—274

S. Bujak, A. Imielski i *I. Zakrzewska*

PRÓBY ZASTĄPIENIA MĄKI JĘCZMIENNEJ AUTOLIZATAMI DROŻDŻY, WYCIERKĄ ZIEMNIACZANĄ I WODĄ SOKOWĄ JAKO DODATKAMI DO ZACIERÓW MELASOWYCH FERMENTACJI ACETONOWO-BUTANOLOWEJ

Z Zakładu Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Lublinie

Wpłynęło dnia 12 października 1959 r.

Proces fermentacji acetonowo-butanolowej może ulegać różnym zakłóceniom pod wpływem licznych czynników. Do czynników tych należą przede wszystkim: skład chemiczny podłoża, zakażenia obcymi bakteriami i bakteriofagami oraz utrata aktywności fermentacyjnej przez szczepy produkcyjne. Zagadnienie optymalnego składu podłoża stało się istotne, gdy do produkcji rozpuszczalników na drodze fermentacji zaczęto używać ubocznych produktów różnych przemysłów, a zwłaszcza melasu. Melas jest bogaty w węglowodany, a związki azotowe, których zawiera niewiele, występują głównie w postaci prostszych połączeń. Fermentacja na zacierach sporządzanych z produktów roślinnych zachodziła na ogół dobrze i dlatego Tatum, Peterson i Fred (1934, 1935) podejrzewali, że produkty te zawierają substancje aktywujące rozwój i fermentację *Clostridium acetobutylicum*. Badacze ci wydzielili z zacierów ziemniaczanych substancję oddziaływającą korzystnie na proces fermentacji. Substancją tą okazała się l-asparagina. Podobny wpływ wywierał kwas glutaminowy, a wg Daniela, Woolleya i Persona (1939) również kwas hydroksyglutaminowy.

Jerusalimski (1934, 1935) stwierdził, że zahamowania fermentacji acetonowo-butanolowej są spowodowane nie brakiem specyficznego aktywatora, lecz raczej niewłaściwym składem pożywienia azotowego. Według tego badacza obecność w podłożu dostatecznej ilości związków białkowych zapewniała normalny przebieg fermentacji. Białek nie można zastąpić produktami ich hydrolizy.

Wyniki badań Jerusalimskiego potwierdzili Szaposznikow i współpracownicy (1939). Po dodaniu do roztworu melasu fosforanów

i białka w postaci ziarn zbóż uzyskali oni normalną wydajność acetonu i butanolu.

Według Kovatsa (1951) przebieg fermentacji zależy również od jakości melasu. Użyte przez niego melasy, otrzymane w tej samej cukrowni, lecz w okresie różnych kampanii, dawały różne wydajności rozpuszczalników.

Zalesska (1955) badała wpływ stosunku ilości białka do zawartości węglowodanów w zacierze na przebieg fermentacji. Stwierdziła ona, że bakterie przy nadmierze związków białkowych wytwarzały mniejsze ilości butanolu. W tych warunkach szybko nagromadzały się w większych ilościach produkty proteolizy, hamujące przejście fermentacji w drugą fazę. Przy niskiej zawartości białka w zacierze uzyskiwano dobre wydajności rozpuszczalników (Zalesska 1956). Manteufel (1941) wykazała, że białko wprowadzone do zacieru indukuje wytwarzanie enzymów proteolitycznych przez bakterie. Enzymy te powodowały lizę komórki w drugiej fazie fermentacji.

Na podstawie licznych badań okazało się, że melas może być użyty do produkcji rozpuszczalników, ale dopiero po wzbogaceniu go w substancje białkowe. Obecnie stosuje się jako źródło substancji białkowych następujące dodatki: mąkę zbożową, makuchy (Legg i Taroin 1938), kiełki słodowe i in. Według Weizmana korzystnie wpływa na przebieg fermentacji również autolizat drożdży (Daniel i współpracownicy 1939).

BADANIA WŁASNE

MATERIAŁ I METODY

Celem tej pracy było zbadanie możliwości zastąpienia mąki zbożowej ubocznymi produktami przemysłu rolnego przy produkcji acetonu i butanolu na zacierach melasowych. Do badań użyto wody drożdżowej, autolizatów drożdży piekarnianych i piwowarskich, wycierki ziemniaczanej i wody sokowej z krochmalni. Jako kontrola służyły zaciery melasowe zawierające 3,5% sacharozy, 1% mąki jęczmiennej i 0,1% fosforanu dwuamonowego.

Do doświadczalnych zacierów melasowych dodawano, zamiast mąki jęczmiennej, 0,15 - 2,0% autolizatów drożdży lub 1 - 4% suchej masy wycierki. Zaciery fermentacji od nru 38 do nru 43 sporządzono przy użyciu wody sokowej zamiast wody wodociągowej. Dodatek wody drożdżowej wynosił 0,5 - 10% objętości zacieru. Fermentacje prowadzono w kolbach Erlenmayera przy użyciu szczepu *M Clostridium acetobutylicum*. Powierzchnię zacieru w kolbach zalewano olejem parafinowym w celu stworzenia warunków beztlenowych. Czas trwania każdej fermentacji wynosił 62 godziny w temperaturze 37°. W odfermentowanych zacierach oznaczano zawartość acetonu metodą Messinger-Godwina, butanolu — metodą

Johnsona. Jako szczepionki używano 10 ml 24-godzinnej hodowli *Cl. acetobutylicum* wyrosłej na zacierze ziemniaczanym. Początkowo *pH* zacierów wynosiło 6,5 - 6,7.

Autolizaty drożdży sporządzano przez zadziałanie na drożdże solą kuchenną w temperaturze 50° przez okres 3 dni. Co 12 godzin autolizat podgrzewano do temperatury 75° na okres 15 minut w celu zabicia wegetatywnych form drobnoustrojów.

Tabela I

Wpływ autolizatów drożdży na produkcję acetonu i butanolu przez *Cl. acetobutylicum*

Influence of yeast autolysates on the production of acetone and butyl alcohol by *Cl. acetobutylicum*

Nr fermentacji / Fermentation №	Rodzaj autolizatu / Kind of autolysate	Ilość % / Final concentration p. c.	W 100 ml zacieru g / per 100 ml of mash grams		Wydajność acetonu i butanolu w stosunku do kontroli % / Yield of acetone and butanol, p. c. of control	
			Aceton	Butanol	Aceton	Butanol
1	Kontrola bez dodatku		0,425	0,820	—	—
2	Woda drożdżowa	0,5	0,039	0,082	8,8	9,6
3		1,0	0,070	0,143	15,9	16,7
4		2,0	0,121	0,251	27,4	29,3
5		4,0	0,223	0,445	50,7	51,9
6		6,0	0,344	0,697	78,0	81,4
7		8,0	0,349	0,680	79,1	79,4
8		10,0	0,348	0,689	78,9	80,5
9	Kontrola		0,442	0,889	—	—
10	Autolizat drożdży browarniczych	0,15	0,296	—	66,9	—
11		0,25	0,334	0,740	75,5	83,2
12		0,50	0,389	0,858	88,0	96,5
13		1,00	0,382	0,894	86,4	100,5
14		1,50	0,377	0,864	85,3	97,1
15		2,00	0,372	0,873	84,1	98,2
16	Kontrola		0,427	0,847	—	—
17	Autolizat drożdży piekarnianych	0,50	0,283	0,745	66,2	87,9
18		0,70	0,397	0,884	92,9	104,3
19		1,00	0,370	0,848	86,6	100,1
20	Autolizat drożdży browarniczych+mąka jęczmienna	0,50 + 0,50	0,389	0,882	91,1	104,1
21	Autolizat drożdży browarniczych+mąka jęczmienna	0,50 + 0,75	0,446	0,905	104,4	106,8
22	Autolizat drożdży browarniczych+mąka jęczmienna	0,50 + 1,00	0,471	0,917	110,3	108,2

Tabela II

Wpływ dodatków wycierki, wody sokowej i autolizatów drożdży na wydajność acetonu i butanolu

Influence of the addition of potato-pulp, starch factory water and yeast autolysates on the production of aceton and butyl alcohol

Nr fermentacji / Fermentation №	Rodzaj autolizatu / Kind of autolysate	Ilość % / Final concentration p. c.	W 100 ml zacieru g / Per 100 ml of mash grams		Wydajność acetonu i butanolu w stosunku do kontroli % / Yield of acetone and butanol, p. c. of control	
			Aceton	Butanol	Aceton	Butanol
23	Kontrola		0,451	0,876	—	—
24	Wycierka ziemniaczana	1,0	0,404	0,840	89.6	95,9
25		2,0	0,422	0,844	93,6	96,4
26		3,0	0,384	0,830	85,1	94,8
27		4,0	0,342	0,739	76,1	84,4
28	Kontrola		0,450	0,881	—	—
29	Wycierka ziemniaczana + autolizat drożdży	2,0 + 0,15	0,398	0,843	88,4	95,7
30	Wycierka ziemniaczana + autolizat drożdży	2,0 + 0,25	0,428	0.860	95,1	97,6
31	Wycierka ziemniaczana + autolizat drożdży browarn.	2,0 + 0,50	0,388	0,837	86,2	95.0
32	Wycierka ziemniaczana + autolizat drożdży browarn.	2,0 + 1,0	0,375	0,820	83,3	93,1
34	Wycierka ziemniaczana + autolizat drożdży browarn.	2,0 + 1,5	0,359	0,813	78,0	92,3
35	Wycierka ziemniaczana + autolizat drożdży browarn.	2,0 + 2,0	0,338	0,800	75,1	90,8
36	Kontrola		0,499	0,876	—	—
37	Woda sokowa 100 ml		0,350	0,731	78,0	83,5
38	Woda sokowa + autolizat drożdży browarn.	2.0 + 0,14	0,357	0,710	79,5	80,8
39	Woda sokowa + autolizat drożdży browarn.	2,0 + 0,25	0,363	0,722	80,9	82,1
40	Woda sokowa + autolizat drożdży	0,50	0,366	0,715	81,5	81,3
41		1,0	0,369	0,740	82,2	84,2
42		1,5	0,372	0,753	85,7	85,9
43		2,0	0,366	0,717	81,5	81,6

WYNIKI

Ogółem przeprowadzono 43 próby fermentacyjne, każdą w 2 równoległych powtórzeniach, których średnie wyniki zebrano w tabelach I i II.

Okazało się, że woda drożdżowa i woda sokowa nie stymulowały wytwarzania rozpuszczalników przez *Cl. acetobutylicum*. Wydajność rozpuszczalników przy dodawaniu tych substancji wynosiła zaledwie około 78% acetonu i 80 - 83% butanolu w stosunku do kontroli. Podobny efekt uzyskano przy użyciu autolizatu drożdży i wycierki ziemniaczanej (maksymalna wydajność acetonu wynosiła 87 - 93%). Wydajność butanolu przy użyciu autolizatu drożdży była przy tym nieco wyższa niż przy stosowaniu wycierki. Łączne użycie autolizatu i wycierki nie zwiększyło wydajności rozpuszczalników. Wydaje się, że autolizaty drożdży, wycierka ziemniaczana i woda sokowa nie mogą całkowicie zastąpić mąki jęczmiennej jako aktywatora fermentacji acetonowo-butanolowej. Dlatego też w dalszych badaniach prowadzono próby częściowego zastąpienia mąki jęczmiennej autolizatami drożdży.

Okazało się, że przez zastąpienie $^1/_2$ dawki mąki jęczmiennej autolizatem drożdży można uzyskać wyższą wydajność butanolu niż w kontroli; wydajność acetonu była przy tym jednak niższa o około 10% w porównaniu do fermentacji kontrolnych. Zastąpienie autolizatem drożdży $^1/_4$ dawki mąki jęczmiennej przyczyniło się do uzyskania znacznie wyższej wydajności obu rozpuszczalników niż w kontroli.

OGÓLNE WNIOSKI

1. Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że wodą drożdżową i wodą sokową z krochmalni nie można zastąpić dodatku mąki jęczmiennej przy produkcji rozpuszczalników na zacierach melasowych.

2. Dodatki do zacierów melasowych autolizatów drożdży piekarnianych i piwowarskich zamiast mąki jęczmiennej wpływały dodatnio na wytwarzanie butanolu, ale obniżały o około 10 - 15% wydajności acetonu.

3. Na zacierach melasowych z dodatkiem 1 - 3% suchej masy wycierki ziemniaczanej uzyskiwano 85 - 93% acetonu i 94 - 96% butanolu w porównaniu do kontroli.

4. Podobne wydajności rozpuszczalników uzyskiwano po dodaniu autolizatów drożdży łącznie z wycierką ziemniaczaną.

5. Częściowe zastąpienie mąki jęczmiennej autolizatami drożdży wpływało korzystnie na wydajności obu rozpuszczalników. Uzyskane w tej kombinacji wydajności wynosiły: 91 - 110% acetonu i 104 - 108% butanolu, w porównaniu do kontroli.

LITERATURA

Mc Daniel L. E., Woolley D. W., Peterson W. H. 1939: Growth factors for bacteria. VII Nutritional requirements of certain butyl alcohol producing bacteria. *J. Bact.* **37** : 259.

Jerusalimski N. D., 1934: Zawisimost processa acetonobutilowogo brożenija. *Mikrobiołogija,* **3** : 44.

Jerusalimski N. D., 1935: Wozmożno li normalnoje acetonobutilowoje brożenije na iskustwiennych sredach. *Mikrobiołogija,* **4** : 504.

Legg D. A., Taroin N. R., 1938: Fermentation of beet molasses. Patent U. S. A., nr 2 107 262.

Kovats J., 1951: Fermentacja melasów pochodzących z różnych okresów kompanii cukrowniczej. *Gazeta Cukrownicza,* **4** : 79.

Manteufel A. J., 1941: Awtoliz acetonobutilowych bakterii. *Mikrobiołogija,* **10** : 273.

Szaposznikow W. N., Manteufel A. J., Jerusalimski N. D., Zubkowa K. I., Bechterowa M. N., 1939: Acetonobutilowoje brożenije na melassie. *Mikrobiołogija,* **8** : 38.

Tatum E. L., Peterson W. H., Fred E. B., 1934: An unknown factor stimulating the formation of butyl alcohol by certain butyric acid bacteria. *J. Bact.,* **27** : 207.

Tatum E. L., Peterson W. H., Fred E. B., 1935: Identification of asparagine as the substance stimulating the production of butyl alcohol by certain bacteria. *J. Bact.,* **29** : 563.

Zalesska M. I., 1955: Wlijanije sostawa sredy na acetonobutilowoje brożenije. *Mikrobiołogija,* **24** : 455.

Zalesska M. I., 1956: O roli proteoliticzeskich fermentow *Clostridium acetobutylicum* w acetonobutilowom brożenii. *Mikrobiołogija,* **25** : 593.

S. Bujak, A. Imielski and *I. Zakrzewska*

THE SUITABILITY OF YEAST AUTOLYSATES, POTATO-PULP AND STARCH FACTORY WATER AS ADDITION TO MOLASSES MASH IN ACETONE-BUTYL ALCOHOL FERMENTATION

Summary

It was the aim of the authors to investigate the suitability of some by-products of agricultural industry for the enrichment of molasses mash in acetone and butanol production. In this connection, the effect of yeast extract, baker and brewery yeast autolysates, potato-pulp and starch factory water on production of the solvents by *Cl. acetobutylicum* was studied. Fermentation of molasses with barley flour (1%) and $(NH_4)_2HPO_4$ (0,1%) was used as a control.

No increase in the final concentrations of acetone and butanol was noted, when potato-pulp, yeast extract and starch factory water were added to fermenting mash.

On the other hand, yeast autosylates influenced the fermentation process positively. This stimulation was specially marked, when 0,5% of yeast autolysate was added to the mash enriched with 0,5 - 0,75% of barley flour; the output of acetone and butanol was then increased by 4 - 10 p.c.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9: 275—287

J. Kovats

BADANIA NAD FERMENTACJĄ CYTRYNOWĄ WGŁĘBNĄ

Z Instytutu Przemysłu Cukrowniczego w Warszawie
Pracownia w Raciborzu

Wpłynęło dnia 29 lipca 1959 r.

Od czasu odkrycia przez W e h m e r a w 1892 r. zdolności *Penicillium* do tworzenia kwasu cytrynowego, problemy związane z tym zagadnieniem zostały na tyle opanowane, że pozwoliły na uruchomienie w 1924 r. produkcji kwasu cytrynowego metodą powierzchniową. Sposób ten jest jednak uciążliwy. Wymaga wielkiej ilości tac i rozległych pomieszczeń. Utrudnia to w wysokim stopniu utrzymanie jałowości całego procesu oraz uniemożliwia jego mechanizację i automatyzację. W tych warunkach przejście na fermentację wgłębną byłoby bardzo pożądane i pozwalałoby osiągnąć znaczne korzyści (niższy koszt obsługi, krótszy okres fermentacji, łatwiejsze utrzymanie jałowych warunków pracy). Próby opracowania tego zagadnienia trwały dziesiątki lat bez widocznego rezultatu. Dopiero w ostatnich latach zagadnienie fermentacji cytrynowej metodą wgłębną zostało pozytywnie rozwiązane. Według patentu S z ü c s a (1944) fermentacja cytrynowa wgłębna jest możliwa na pożywce dostatecznie przewietrzanej, zawierającej sole mineralne w odpowiednim stosunku. Po upływie 4 dni fermentacja jest zasadniczo zakończona, a wydajność kwasu cytrynowego w przeliczeniu na cukier waha się w granicach 70 - 75%.

W a k s m a n i współpracownicy (1946) donoszą, że wśród licznych grzybów należących do rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium*, zdolnych do produkcji kwasu metodą wgłębną, najbardziej aktywny jest *A. wenti* opisany przez Wehmera. Według tych autorów najkorzystniejszy do fermentacji cytrynowej okazał się roztwór o następującym składzie: sacharoza — 150 g, mocznik — 1 g, $MgSO_4 . 7 H_2O$ — 0,5 g, KH_2PO_4 — 0,08 g, KCl — 0.15 g, $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ — 0,02 g, $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ — 0,01 g, wody — 1000 ml. Roztwór ten zakwaszano kwasem solnym do *pH* 2. Pożywkę szczepiono zarodnikami, przy czym rozwój grzybni prowadzono przy ciągłym wstrząsaniu bądź rotacji roztworu. Przez cały ciąg fermen-

tacji kultury przewietrzano powietrzem lub tlenem. Do osiągnięcia dobrych wyników fermentacji konieczne jest, aby grzybnia przyjmowała kształt perełkowaty lub ziarnisty. Grzybnia o formach kłaczkowatych lub nitkowatych tworzy mało kwasu. Z chwilą gdy grzybnia osiągnie pożądany kształt, zalecają oddzielić ją od roztworu wzrostowego i przenieść do roztworu fermentacyjnego o następującym składzie: sacharoza 150 g, mocznik — 0,5 g, KH_2PO_4 — 0,05 g, KCl — 0,15 g, $MnSO_4 . 4 H_2O$ — 0,02 g, $ZnSO_4 . 7 H_2O$ — 0,01 g, wody — 1000 ml. *pH* roztworu 2. Autorzy twierdzą, że zamiast sacharozy można użyć melasu po uprzednim jego oczyszczeniu.

K a r o w i W a k s m a n (1957) zbadali wpływ różnych substancji (ekstraktów zbożowych i drożdżowych itp.) na tworzenie kwasu cytrynowego przez *A. wenti*. Wyciągi te przyspieszają wzrost pleśni, lecz nie wpływają korzystnie na tworzenie się kwasu cytrynowego. Autorzy badali również wpływ różnych soli mineralnych, głównie azotowych i fosforowych. Doszli do wniosku, że stężenie soli mineralnych w roztworze musi być ograniczone do minimum warunkującego nieznaczny rozwój pleśni.

S z ü c s w patencie z 1948 r. podał ulepszoną metodę produkcji kwasu cytrynowego, polecając pożywkę o składzie na 1 l wody: sacharoza — 150 - 160 g, KH_2PO_4 — 0,15 - 1,0 g, $MgSO_4 . 7 H_2O$ — 4,3 g, NH_4NO_3 — 3,3 g, KCl — 0,3 g, $CaCl_2 . 2 H_2O$ — 3 g, mleko w proszku — 0,5 - 1,0 g, zakwaszona kwasem solnym do *pH* 1,8 - 2,0. Hodowlę przewietrzał (700 ml powietrza na 2 litry roztworu na minutę). Fermentacja przebiegała w temperaturze 18 - 20°. W ciągu 9 dni fermentacji wydajność kwasu cytrynowego dochodziła do 72 %. Na pożywce bez dodatku mleka wydajność wahała się między 50 a 55 %. Ważne jest, aby w czasie fermentacji nie dopuścić do nadmiernego wzrostu grzybni, która powinna posiadać kształt i wielkość ziarenek kawioru.

S h u i J o h n s o n (1948) przeprowadzali fermentację w kolbach wstrząsanych, przy czym najlepsze wyniki otrzymali na pożywce zawierającej w litrze wody 140 g sacharozy, 0,5 g KH_2PO_4, 0,25 g $MgSO_4 . 7 H_2O$, 2,5 g azotanu amonu, 1 mg żelaza. Po 9 dniach fermentacji wydajność kwasu dochodziła do 70 %.

S c h w e i g e r i S n e l l (1949) opisali metodę dekationizacji cukru surowego i fermentacji w obecności morfoliny w kolumnowym fermentatorze. Roztwór zaszczepiony zarodnikami był energicznie przewietrzany.

Ż u r a w s k i (1951) poddał dyskusji cały problem wgłębnej produkcji kwasu cytrynowego. Na proces tworzenia się kwasu cytrynowego decydujący wpływ wywiera azot i fosfor. Zmiany koncentracji tych dwóch pierwiastków w roztworze gwałtownie zmieniają rodzaj wytworzonych

kwasów i zdolność do syntezy kwasu cytrynowego. Zmniejszenie zawartości fosforanów prowadzi do wzmożonej, ubocznej syntezy kwasu glukonowego, natomiast zwiększenie ich ilości powyżej pewnego optimum obniża tworzenie się kwasu cytrynowego.

Martin i Walters (1952) używali do fermentacji roztworów melasowych oczyszczanych żelazocyjankiem potasowym, wzbogaconym 0,01 - 0,05-procentowym K_2HPO_4. Wydajność kwasu cytrynowego po 3 - 4 dniach dochodziła do 60 %. Według tych autorów oczyszczanie pożywek kationitami jest zbędne.

Również Clement (1952) oczyszczał roztwory melasowe żelazocyjankiem potasowym. Fermentację przeprowadzał na trzęsawkach i w aparatach Kluyvera, przewietrzając hodowle przez pierwsze dni powietrzem, a potem tlenem. Maksymalna wydajność kwasu cytrynowego wynosiła około 52 %.

Moyer (1953) polecał podłoże z dodatkiem 1 - 3 % metanolu lub etanolu. Dodatek tych składników ma zwiększać wydajność kwasu cytrynowego i niwelować szkodliwe działanie żelaza i manganu.

Steel, Lenz i Martin (1955) badali różne czynniki wpływające na produkcję kwasu cytrynowego w naczyniach fermentacyjnych o pojemności 2,5 i 36 litrów. Optymalne dawki żelazocyjanku potasowego, w zależności od pochodzenia melasu, wynosiły 0,5 - 0,9 g na litr roztworu. Natomiast dodatek $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$ okazał się szkodliwy, sprzyjając tworzeniu kwasu szczawiowego. Optimum temperatury wahało się około 31°, *pH* roztworu około 7.

Żurawski (1955) opracował sposób fermentacji, który zdaje się w pełni odpowiadać stawianym wymaganiom. Wzrost grzybni i fermentacja przebiegały w jednym roztworze o składzie bardzo prostym: sacharozy — 150 g, NH_4NO_3 — 2,5 g, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ — 0,25 g, KH_2PO_4 — 0,16 g, w 1000 ml wody. Roztwór szczepił zarodnikami *A. niger*, wyhodowanymi metodą powierzchniową. Fermentacja przebiegała w kadziach zaopatrzonych w mieszadła oraz urządzenia do napowietrzania cieczy przy temperaturze 30 - 32° w ciągu 10 dni. Najlepsze rezultaty otrzymał przy 300 obrotach mieszadła na minutę z równoczesnym silnym przewietrzaniem. Wydajność kwasu cytrynowego wahała się w granicach 50 - 70 %.

Martin (1957) podał wyniki prób fermentacji na melasie, przeprowadzonych w National Research Laboratories of Canada, w fermentatorach o pojemności 2,5 i 40 litra. Roztwory przewietrzano początkowo powietrzem, a później tlenem w temperaturze 31°. Wydajność kwasu cytrynowego dochodziła do 70 %. W czasie fermentacji tworzył się również kwas szczawiowy.

Kovats (1958) opisał metodę produkcji kwasu cytrynowego stosowaną w Związku Radzieckim. Stosując tę metodę otrzymuje się 80 - 90% kwasu cytrynowego, 10 - 20% kwasu szczawiowego i glukonowego. Wydajność kwasu cytrynowego (w stosunku do zużytego cukru) wynosi około 40 %.

BADANIA WŁASNE

W badaniach przeprowadzanych na roztworach sacharozy posługiwano się pożywką Żurawskiego (1955). Wszystkie roztwory sporządzano na wodzie wodociągowej, gdyż wstępne badania na wodzie destylowanej dały gorsze wyniki. Do 1000 ml 15-procentowego roztworu sacharozy dodawano 2,5 g NH_4NO_3, 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, i 0,16 g KH_2PO_4. Do doświadczeń używano sacharozy rafinowanej, chociaż w niektórych doświadczeniach z sacharozą nierafinowaną otrzymano również dobre rezultaty. Fermentację prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 300 ml, zawierających po 50 ml pożywki. Kolby zatykano korkami z waty i wyjałowiano w temperaturze 110°. Roztwory szczepiono zarodnikami *A. niger* przy pomocy oczka platynowego. Kolbki umieszczano na trzęsawce (około 100 wstrząsów na minutę) w temperaturze pokojowej (20 - 24°). W czasie trwania tego procesu część roztworu wyparowywała. Z tego powodu co 2 - 3 dni uzupełniano płyn kilkoma ml wody destylowanej. Po fermentacji oznaczano w roztworze kwasowość ogólną przez miareczkowanie 2 ml płynu 0,1 N NaOH wobec fenolftaleiny. Otrzymane kwasowości przeliczano na kwas cytrynowy po odjęciu kwasowości przypadającej na kwas szczawiowy, który oznaczano na drodze analitycznej według metody opisanej w Poradniku Mikrobiologa (Wojcieszak 1958). Odczyn roztworu oznaczano potencjometrem przy użyciu szklanej elektrody.

WYNIKI

W pierwszej fazie doświadczeń zmierzano do wyselekcjonowania kultury *Aspergillus niger*, która najlepiej nadawałaby się do fermentacji wgłębnej.

W tym celu zebrano około 50 szczepów *A. niger* z ośrodków krajowych i zagranicznych. Selekcję przeprowadzano w ten sposób, że z hodowli o najwyższej kwasowości przenoszono odrobinę grzybni na skośny ziemniak. Po wytworzeniu się zarodników wysiewano je na szkiełku nakrywkowym w kropli wiszącej. Otrzymane z jednego zarodnika kolonie przenoszono ponownie do probówek z ziemniakiem. Po rozwinięciu się grzybni i wykształceniu zarodników przenoszono je na pożywkę fermentacyjną płynną. Roztwory w kolbach umieszczano na trzęsawce. Po 7, 10 lub 14 dniach fermentacji określano kwasowość roztworów. Z kolbek, które wykazały najwyższą kwasowość, przenoszono odrobinę grzybni na ziemniak. Dalszą selekcję prowadzono jak poprzednio. Jedno z takich końcowych doświadczeń, przedstawiające produkcję kwasu przez różne szczepy *A. niger*, podano w tabeli I.

Tabela I

Porównanie przebiegu fermentacji różnych szczepów *Aspergillus niger*
Der Fermentationsverlauf auf verschiedener *Aspergillus niger*-Stämme

Szczep Kulturstamm	Kwasu cytrynowego w 100 ml roztworu w g po: g von Zitronensäure in 100 ml Flüssigkeit nach:	
	7 dniach fermentacji 7 Fermentationstagen	14 dniach fermentacji 14 Fermentationstagen
Produkcyjny z Raciborza Produktions-kultur	1,3	2,6
A_1*	1,2	2,3
A_2*	1,4	2,4
A_3*	0,7	2,3
C_1*	2,5	3,2
C_2*	2,6	3,1

* szczepy otrzymane z muzeum w Pradze

Okazało się, że jedynie szczepy C_1 i C_2 mogą być brane pod uwagę w dalszej selekcji. Doświadczenia selekcyjne przeprowadzone ze szczepem C_1 pozwoliły w ciągu kilkunastu miesięcy otrzymać kulturę, której aktywność była znacznie większa od szczepu wyjściowego.

W dalszych badaniach na roztworze rafinowanego cukru (15 %) określono wszystkie ważniejsze parametry dla ustalenia optymalnych warunków fermentacji dla wyżej podanego szczepu. Jedno z takich doświad-

Tabela II

Przebieg fermentacji w roztworach sacharozy o różnych *pH*
Der Fermentationsverlauf von Saccharose Flüssigkeiten mit verschiedenem *pH* Wert

pH roztworu *pH* der Flüssigkeit	Kwasu cytrynowego w 100 ml rozworu w g, po: g von Zitronensäure in 100 ml Flüssigkeit nach:	
	7 dniach fermentacji 7 Fermentationstagen	10 dniach fermentacji 10 Fermentationstagen
5,0	1,9	2,5
2,7	2,4	3,3
2,4	2,7	5.0
2,2	3,0	6,2
2,1	2,2	4,0
2,0	1,7	3,1

czeń, które miało na celu znalezienie najkorzystniejszego *pH* roztworu fermentacyjnego, podano w tabeli II. W doświadczeniu tym poszczególne roztwory w kolbach zakwaszano kwasem solnym w granicach *pH* 2 - 5. Roztwory zakwaszano po sterylizacji, aby uniknąć inwersji cukru w czasie wyjałowiania.

Najkorzystniejsze *pH* roztworu leży w granicach około 2,2. Wyniki te potwierdzają doniesienia innych autorów, według których fermentacja cytrynowa wgłębna przebiega najlepiej w środowiskach o niskim *pH*.

Należy podkreślić, że w fermentacjach prowadzonych na podłożach o zmiennych *pH* obserwuje się różny rozwój grzybni w zależności od początkowego *pH*. Różnice te występują szczególnie wyraźnie u szczepów słabo kwaszących. W czasie normalnie przebiegającej fermentacji grzybnia formuje się w drobne kuleczki, których wielkość w pierwszych dniach rozwoju dochodzi do wielkości ziarna maku, a w późniejszych okresach do wielkości ziarna kawioru. U szczepów słabo kwaszących, przy *pH* w granicach 6 - 6,5, grzybnia ma wygląd dobrze wykształconych kulek. Przy obniżeniu początkowego *pH* do 5 średnica kulek staje się mniejsza. Przy *pH* niższym niż 5 — grzybnia przybiera formę nitkowatą. Normalnie w tym stanie sformowania grzybni kwasu tworzy się mało. Należy zaznaczyć, że w obserwacjach tego rodzaju powinno się również brać pod uwagę wpływ, jaki wywiera mieszanie przy pomocy trzęsawki lub mieszadła. Grzybnia nie formuje się w kulki, jeżeli mieszanie jest zbyt silne. Jeśli jednak nawet dojdzie do tego w pierwszym okresie fermentacji, to w dalszym etapie zostaje ona rozbita na bezkształtną masę, co wpływa niekorzystnie na końcowy wynik fermentacji.

FERMENTACJA NA ROZTWORACH MELASOWYCH

Zasadniczym celem, do którego zmierzano w dalszych doświadczeniach, było znalezienie optymalnych warunków fermentacji prowadzonej na roztworach melasowych. Mimo bowiem uruchomienia za granicą produkcji kwasu cytrynowego metodą wgłębną, nie opublikowano szczegółowych danych z tej dziedziny. Poza tym melas (uwzględniając zawarty w nim cukier) jest surowcem około 3 razy tańszym od cukru, co ma podstawowe znaczenie dla rentowności produkcji.

Pierwsze doświadczenie przeprowadzone na melasie zmierzało do tego, aby znaleźć optymalną dawkę melasu dla przebiegu fermentacji.

Ponieważ nie wszystkie melasy nadają się do produkcji kwasu cytrynowego, użyty do doświadczeń melas poddawano próbom fermentacyjnym przy zastosowaniu metody powierzchniowej. Doświadczenie przeprowadzano w kolbach Erlenmayera zawierających szereg roztworów melasu o różnym stężeniu sacharozy,

w granicach 7,5 - 25%. Wszystkie roztwory zakwaszano kwasem siarkowym do *pH* 6,4 i zadawano różnymi ilościami żelazocyjanku potasowego, z takim wyliczeniem, aby na każde 100 g melasu przypadło 0,17 g tego połączenia. Roztwory wyjałowiano przez 20 minut w temperaturze 110°. Po sterylizacji odczyn roztworu doprowadzano do *pH* 7 i podłoże wyjałowiano jeszcze raz w parze przez 15 minut. Po zaszczepieniu, kolby z roztworami umieszczano na trzęsawce. Fermentację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 10 dni. Po tym czasie oznaczano w roztworze ogólną kwasowość przez miareczkowanie, a kwas szczawiowy analitycznie.

Wyniki doświadczenia zebrano w tabeli III.

Tabela III

Przebieg fermnetacji na roztworach o różnej koncentracji melasu

Der Fermentationsverlauf der Melasselösungen mit verschiedenem Melassegehalt

Cukru w roztworze melasowym % Zuckergehalt der Melasselösung %	Kwasu cytrynowego w 100 ml roztworu w g po: g von Zitronensäure in 100 ml Flüssigkeit nach: 7 dniach 7 Tagen	10 dniach 10 Tagen fermentacji Fermentationszeit	Wydajność po 10 dniach w % Die Ausbeute nach 10 Tagen Gärungsdauer %	Kwasu szczawiowego — po 10 dniach Oxalsäuregehalt nach 10 Tagen g w 100 ml roztworu g in 100 ml der Lösung	w stosunku do kwasu cytrynowego % im Verhältniss zum Zitronensäuregehalt %
7,5	4,2	3,2	40,3	1,22	38,1
10,0	5,9	4,6	46,0	1,23	26,7
12,5	6,4	6,3	51,1	1,33	21,1
15,0	4,9	7,0	46,6	0,43	6,1
17.5	4,2	6,3	36,0	0,0	0,0
20,0	2,8	4,2	21,0	0,0	0,0
22,5	1,8	3,5	15,1	0,0	0.0
25,0	1,5	2,5	10,0	0,0	0,0

Optymalne stężenie cukru w roztworze melasowym zawiera się w przedziale 12,5-15%, co odpowiada roztworom o gęstości 21-23° Bllg. Przy tych koncentracjach cukru wydajności kwasu cytrynowego wahają się w granicach 45-50%. Obserwuje się przy tym zależność między gęstością roztworu melasu a czasem fermentacji. Normalnie w zacierach zawierających 12,5% i mniej cukru fermentacja kończy się już po 7 dniach. Natomiast przy koncentracji cukru wynoczącej 15% proces ten trwa 10 dni. Wynika z tego, że korzystniej jest fermentować roztwory o niższej zawartości cukru, aniżeli zwiększać koncentrację cukru w roztworze i przedłużać okres fermentacji. Podobne zalecenia daje Żurawski, który w fermentacji cytrynowej wgłębnej na skalę techniczną stosuje roztwory melasowe zawierające 12% cukru. Wykazano, że im niższe

jest stężenie cukru w roztworze melasowym, tym więcej tworzy się kwasu szczawiowego w stosunku do kwasu cytrynowego. Przy koncentracji cukru wynoszącej 7,5% około połowa ogólnej ilości kwasów przypada na kwas szczawiowy. Przy wzroście stężenia cukru do 12,5% już tylko około 1/4 ogólnej ilości kwasów przypada na kwas szczawiowy, natomiast przy wzroście koncentracji cukru do 15% ilość kwasu szczawiowego wybitnie maleje, spadając poniżej 10% ogólnej ilości kwasów. W zacierach zawierających 17,5% cukru kwasu szczawiowego nie znaleziono w ogóle. Fermentacja przy tak wysokich stężeniach cukru jest jednak nieekonomiczna ze względu na niską wydajność kwasu cytrynowego. Również Żurawski wskazuje na tworzenie się innych kwasów w czasie fermentacji. Według niego 80 - 90% ogólnej ilości kwasów przypada na kwas cytrynowy, reszta zaś na kwas szczawiowy i glukonowy.

W dalszym ciągu doświadczeń postanowiono zbadać, jak będzie przebiegać fermentacja na zacierach melasowych, zawierających 15% cukru, o różnym *pH*. Roztwór zadano 0,05% żelazocyjanku potasowego, a następnie rozlano po 50 ml do szeregu erlenmayerek. Zaciery zakwaszono różnymi ilościami kwasu siarkowego, nastawiając *pH* w granicach 4,5--7,9 (po sterylizacji *pH* roztworów korygowano kwasem siarkowym i ługiem sodowym). Po 7 i 10 dniach trwania fermentacji oznaczano w roztworach ogólną kwasowość oraz zawartość kwasu szczawiowego.

Wyniki zebrano w tabeli IV.

Tabela IV

Przebieg fermentacji na roztworach melasowych o różnym *pH*

Der Fermentationsverlauf der Melasselösungen mit verschiedenem *pH* Wert.

pH roztworu melasowego *pH* der Melasselösung	Kwasu cytrynowego w 100 ml roztworu w g po: g von Zitronensäure in 100 ml Flüssigkeit nach: 7 dniach 7 Tagen	10 dniach 10 Tagen fermentacji Fermentationszeit	Wydajność (w stosunku do cukru zużytego) po 10 dniach w % Die Ausbeute berechnet auf Zucker nach 10-tätiger Gärungsdauer in %	Kwasu szczawiowego g w 100 ml roztworu Der Oxalsäuregehalt in g auf 100 ml der Lösung
7,9	3,2	5,9	39,3	0,79
7.0	3.2	6,1	40,7	0,75
6,1	3,8	6,0	40,0	0,70
5,7	3,4	6,3	42,0	0,36
5,4	3,0	4,9	32,0	0,20
5,1	2,8	3,5	23,3	0,0
4,8	2,1	3,1	20,7	0,0
4,7	1,4	3,0	20,0	0,0
4,6	1,0	2,1	14,0	0,0
4.5	0,0	0.0	—	—

pH roztworu korzystne dla przebiegu fermentacji leży w granicach 5,7-7. W tym przedziale, kwasowość roztworów utrzymuje się zasadniczo na jednym poziomie. Przy wyższych *pH* obserwuje się zwiększenie przyrostu kwasu szczawiowego w roztworze, co jest zresztą zgodne z danymi z literatury (Bernhauer 1926). W celu zapobieżenia tworzeniu się większych ilości tego kwasu w roztworze wskazane jest prowadzenie fermentacji przy *pH* około 6. Optymalne *pH* fermentującego roztworu badanego melasu leży, przy metodzie wgłębnej, w przedziale 6-7. Z badań Kovatsa i Lewickiej (1954) nad fermentacją powierzchniową wynika, że optymalne *pH* roztworu dla melasów polskich leży w przedziale 6-6,4, Żurawlewa (1956) zaś, dla melasów rosyjskich, znalazła optimum *pH* 7,2-7,5.

W dalszych badaniach postanowiono określić optymalne dawki żelazocyjanku potasowego potrzebne do zapewnienia najlepszych warunków fermentacji. W poprzednich badaniach (Kovats i współpracownicy 1957) znaleziono, że dla fermentacji powierzchniowej dawka ta może być różna i leży w przedziale 0,03-0,07%, przy czym niektóre melasy odznaczają się dużą tolerancją pod tym względem.

W celu określenia właściwej dawki żelazocyjanku potasowego dla fermentacji wgłębnej przygotowano roztwór melasu zawierający 15% cukru o *pH* roztworu 6,2. Roztwór rozlano do szeregu kolbek, a następnie zadano różnymi ilościami żelazocyjanku potasowego w granicach 0,02 - 0,1%. Po sterylizacji i zaszczepieniu kolby umieszczano w trzęsawce. Po 7 i 10 dniach oznaczano kwasowość roztworów.

Wynik doświadczenia zebrano w tabeli V.

Optymalna dawka żelazocyjanku potasowego dla melasu użytego do doświadczenia waha się w granicach 0,04-0,06%. W innych doświadczeniach (tu nie podanych), przeprowadzonych na powyższym melasie metodą powierzchniową, okazało się, że optymalna dawka żelazocyjanku potasowego jest taka sama.

Następne próby fermentacyjne prowadzono w fermentatorze szklanym o pojemności około 6 l, zaopatrzonym w doprowadzenie powietrza od dołu oraz w mieszadło turbinowe dające około 120 obrotów na minutę. Fermentator wyjałowiono formaliną i wypełniono wysterylizowaną pożywką. Roztwory zaszczepiono 4-dniową kulturą wyhodowaną na trzęsawce. Fermentacja przebiegała w temperaturze pokojowej (20-24°). Roztwór melasu przedmuchiwano nawilgoconym powietrzem w ilości 3 l na minutę. Fermentację przeprowadzono zarówno w roztworach sacharozy jak i melasowych. Skład używanych do doświadczeń pożywek był następujący: azotanu amonu — 7,5 g, siarczanu magnezu — 0,75 g, kwaśnego fosforanu potasu — 0,48 g, cukru rafinowanego — 450 g, *pH* roztworu 2,2; melasu (50° o) — 900 g, żelazocyjanku potasowego

Tabela V

Przebieg fermentacji w roztworach melasowych z dodatkiem różnych ilości żelazocyjanku potasowego
Der Fermentationsverlauf der Melasselösungen mit einer Zugabe verschiedener Mengen an Kaliumferrocyanid

Dodano żelazocyjanku potasowego % / Menge an Kaliumferrocyanid %	Kwasu cytrynowego w 100 ml roztworu w g po: / g von Zitronensäure in 100 ml Flüssigkeit nach:	
	7 dniach / 7 Tagen	10 dniach / 10 Tagen
	fermentacji / Fermentationszeit	
ber dodatku / ohne Zugabe	1,7	3,3
0,02	2,2	4,5
0,04	3,0	6,1
0,06	3,0	5,7
0,08	1,2	3,1
0,1	1,0	2,7

Tabela VI

Porównanie przebiegu fermentacji w roztworze sacharozy oraz w roztworze melasowym w fermentatorze 6-litrowym
Vergleich zwischen dem Fermentationsverlauf von Zuker und Melasselösungen in einem 6 Liter fassenden Fermentationsgefäss

Dzień fermentacji / Fermentationstag	Fermentacja w roztworze sacharozy / Fermentationsverlauf der Saccharoselösung	Fermentacja w roztworze melasowym / Fermentationsverlauf der Melasselösung
	kwasu cytrynowego w g, w 100 ml roztworu / der Zitronensäuregehalt in g auf 100 ml der Lösung	
6	1,8	1,6
8	2,1	2,2
10	3,6	4,1
12	6,9	5,3
14	7,9	6,0
15	8,2	5,8
16	8,2	5,6

— 1,5 g, *pH* roztworu 6,2. W obu pożywkach uzupełniano składniki wodą wodociągową do 3 l.

Wyniki fermentacji, z których jedna przebiegała w roztworze sacharozy, a druga w roztworze melasu, podano w tabeli VI.

Otrzymane wyniki wskazują, że fermentacja w roztworach sacharozy przebiega lepiej aniżeli w roztworach melasu. Wydajność kwasu cytrynowego w przeliczeniu na cukier, przy użyciu roztworu sacharozy wynosiła 55%, roztworu melasowego natomiast około 40%. Otrzymane wydajności należy uznać za zadowalające. Jedynie zbyt długi okres fermentacji, trwający 14 dni, budzi zastrzeżenia. Prowadzenie fermentacji w temperaturze 30-31°, optymalnej dla *A. niger*, pozwoliłoby proces ten znacznie skrócić. Dalsze badania w tym kierunku na skalę półtechniczną umożliwią dokładniejsze opracowanie tej metody fermentacji.

STRESZCZENIE

Przeprowadzone badania wykazały co następuje:

1. Szczep *Aspergillus niger* używany do fermentacji powierzchniowej w Raciborzu nie nadaje się do fermentacji wgłębnej.

2. Najkorzystniejsze *pH* dla fermentacji sacharozy mieści się około 2,2, dla roztworów melasu 5,7 - 7,0.

3. Optymalne stężenie cukru w roztworze melasowym wynosi 12,5 - 15%. Zaciery zawierające 12,5% cukru fermentują około 7 dni, a zawierające 15% cukru około 10 dni.

4. Przy użyciu tego samego melasu optymalna dawka żelazocyjanku potasowego jest stała, niezależnie od metody prowadzenia fermentacji (wgłębnie lub powierzchniowo).

5. Im wyższa jest koncentracja cukru w roztworze melasowym, tym mniej tworzy się kwasu szczawiowego. W środowisku zawierającym 17,5% cukru, kwas szczawiowy nie tworzy się wcale. W fermentacjach prowadzonych metodą wgłębną w 6-litrowym naczyniu osiągnięto wydajność kwasu cytrynowego w zacierach sacharozy zawierających 15% cukru — 55%, w roztworach melasowych — 40%.

LITERATURA

Bernhauer K., 1926: Über die Säurebildung durch *Aspergillus niger*. *Bioch Z.*, **172** : 321.

Clement M. T., 1952: Citric acid fermentation of beet molasses by *Aspergillus niger* in submerged culture. *Canad. J. Technol.*, **30** : 82.

Karow S. O., Waksman S. A., 1957: Production of citric acid in submerged culture. *Ind. Eng. Chem.*, **39** : 821.

Kovats J., Lewicka M.,: 1954: Badania nad oczyszczaniem melasów dla celów fermentacji cytrynowej. *Przem. Spoż.*, **10** : 343.

Kovats J., Lewicka M., Kamiński S., 1957: Badania nad różnymi melasami do celów fermentacji cytrynowej. *Przem. Spoż.*, **11** : 156.

Kovats J., 1958: Produkcja kwasu cytrynowego metodą wgłębną. *Przem. Spoż.*, **12** : 303.

Martin S. M., Walters N R., 1952: Production of citric acid by submerged fermentation. *Ind. Eng. Chem.*, **44** : 2229.

Martin S. M., 1957: Citric acid fermentation by submerged fermentation. *Ind. Eng. Chem.*, **49** : 1231.

Moyer A. M., 1953: Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in suface and submerged culture. *Appl. Microbiol.*, **1** : 1.

Shu P., Johnson J. M., 1948: Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. *Ind. Eng. Chem.*, **40** : 1202.

Schweiger L. S., Snell R. S., 1949 U.S.P. nr 2 476 159.

Steel R., Lenz C. P., Martin S. M., 1955: Submerged citric acid fermentation of sugar beet molasses. *Canad. J. Microbiol.*, **1** : 299.

Szücs J., 1944: U.S.P. nr 2 353 771.

Szücs J., 1948: U.S.P. nr 2 438 136.

Waksman S. A., Higland Pork, Karow E. O., 1946: U.S.P. nr 2 394 031.

Wojcieszak P., 1958. Poradnik mikrobiologa w przemyśle fermentacyjnym i owocowo-warzywnym. Praca zbiorowa. Wydawn. Przem. Lekkiego i Spoż., Warszawa.

Żurawlewa E. J., 1958: Podgotowka miełassy k limonnokisłomu brożeńju. *Trudy Inst. Kondit Prom.*, **12** : 20.

Żurawski G. J., 1955: Głubinnyj sposob proizwodstwa limonnoj kisłoty pri pomoszczi griba *Aspergillus niger*. *Mikrobiologija*, **24** : 332.

Zurawski G. J., 1951: Głubinnyj sposob połuczennija limonnoj kisłoty s pomoszczju gribow roda *Aspergillus*. *Dokł. A. N. S. S. S. R.*, **80** : 797.

J. Kovats

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE SUBMERSE GÄRUNG VON ZITRONENSÄURE

Zusammenfassung

Die Untersuchungen über den Verlauf der submersen Gärung von Zitronensäure wurden mit Hilfe von Zuckerlösungen oder Melasselösungen, in den meisten Fällen 15% Zuckergehalt, durchgefürht. Die Gärung fand in Erlenmeyer-Kolben a 300 ml statt. Jeder Kolben enthielt 50 ml der Lösung, welche mit den Sporen *Aspergillus niger* geimpft wurden. Während der Gärung befanden sich die Kolben auf einer Schüttelmaschine bei Zimmertemperatur, 20 - 24°. Die Gärungszeit betrug meistens 10 Tage. Die Ergebnisse waren folgende:

1. Die in Racibórz benutzte Oberflächenimpfkultur *A. niger* eignet sich zu dieser Gärung nicht.

2. Das erfolgreichste *pH* für die Saccharose-Lösung beträgt ungefähr 2,2 für Melasselösungen dagegen 5,7 - 7,0. In diesem Falle beobachten wir die Ähnlichkeit mit der Oberflächengerung.

3. Die optimale Zuckerkonzentration für die Melasselösungen liegt zwischen 12,5 - 15%. Bei einem 12,5% Zuckergehalt endet die Gärung nach ungefähr 7 Tagen, bei 15% Zuckergehalt nach ungefähr 10 Tagen.

4. Beim Gebrauch der gleichen Melasse für die Oberflächen- sowie für die submerse Gärung bleibt die Menge des Kaliumferrocyanids die Gleiche.

5. Zu beobachten ist eine Abhängigkeit zwischen dem Zuckergehalt der Lösung und der Bildung von Oxalsäure als Nebenprodukt. Je höher der Zuckergehalt, desto niedriger Oxalsäurebildung. Bei einer Zuckerkonzentration von 17,5% bildet sich keine Oxalsäure.

6. In den Gärungsprozessen, die in 6 Litergefässen durchgeführt wurden, betrug die Ausbeute auf 15% Zucker bei Saccharoselösungen 55% an Zitronensäure und bei Melasselösungen ungef. 40%.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9: 290—298

M. Kujawski i *K. Piller*

BADANIA NAD OTRZYMYWANIEM PLEŚNIOWYCH PREPARATÓW ENZYMATYCZNYCH-AMYLOLITYCZNYCH

CZ. III. PRÓBY ZASTOSOWANIA WYSŁODZIN BROWARNIANYCH (MŁÓTA) DO PRODUKCJI PLEŚNIOWYCH PREPARATÓW AMYLOLITYCZNYCH

Z Katedry Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Krakowie i Zakładu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie

Wpłynęło dnia 24 sierpnia 1959 r.

WSTĘP

Otręby pszenne używane są dzisiaj powszechnie przy powierzchniowych metodach produkcji pleśniowych preparatów amylolitycznych. Wysoka cena oraz zapotrzebowanie na rynku paszowym nakłaniają jednak do zastąpienia ich tańszym, a równie odpowiednim podłożem dla hodowli pleśni.

Liczne prace opublikowane w ostanim dziesięcioleciu omawiają wykorzystanie w tym celu suszonego wywaru gorzelniczego z ziemniaków, buraków i zboża (Sova 1950, 1953), a przede wszystkim świeżej lub suszonej wycierki ziemniaczanej (Sova 1950). Wysoką wartość zastępczą wycierki ziemniaczanej świeżej (Sosina 1958) i suszonej (Kujawski i Piller 1958) wykazały również badania mające na celu tylko częściowe zastąpienie otrąb. Opracowana na skalę przemysłową metoda ciągłej hodowli pleśni na podłożu z prasowanej wycierki i otrąb pszennych (Mitiukow 1959) dała zupełnie zadowalające wyniki.

W pierwszej naszej pracy (Kujawski i Piller 1958) opisaliśmy udane próby zastosowania podłoża złożonego w 40% z suszonej wycierki ziemniaczanej.

Wyniki uzyskane z prowadzonych równolegle wstępnych doświadczeń (Chruściel 1957) z wysłodzinami browarnianymi (młóto) pozwalały przypuszczać, że po odpowiednim uzupełnieniu, również młóto stanowić będzie dobre podłoże dla rozwoju *Aspergillus oryzae*.

Praca poniższa miała wskazać, czy i w jakim stopniu wysłodziny browarniane zastąpić mogą używane do tej pory podłoża oraz jakich wymagają dodatków, aby uzyskane preparaty pod względem aktywności nie ustępowały preparatom otrzymywanym z kultur hodowanych na otrębach pszennych z wycierką.

METODA PRACY

Podłoże: W skład podłoża wchodziły wysłodziny browarniane, skrobia lub szlam krochmalniczy oraz sole azotowe.

Wysłodziny pochodziły z Browaru Krakowskiego i stanowiły odpad z produkcji piwa jasnego. Pobrano je z 4 różnych warek i po wysuszeniu w 60° zmieszano razem.

Skrobia ziemniaczana „Superior" pochodziła, podobnie jak szlam krochmalniczy, z Krochmalni Luboń. Suszenie szlamu prowadzono tak samo jak suszenie młóta, a suchy szlam mielono na młynku zbożowym.

Przeprowadzono analizę chemiczną wymienionych wyżej składników oraz mieszanki (otręby + wycierka w stosunku 6 : 4). Wodę oznaczano na drodze trzygodzinnego suszenia w 105°. Azot oznaczano metodą mikro-Kjeldahla (Struszyński 1954), skrobię metodą polarymetryczną Eversa, z tym że młóto poddawano uprzednio wyługowaniu ciepłą wodą i alkoholem w celu usunięcia ewentualnych pozostałości cukrów. Błonnik oznaczano metodą Henneberga i Stohmana (*Kalendarz Przemysłu Spożywczego* 1954). Wyniki oznaczeń zebrano w tabeli I.

Tabela I

Zawartość wody, skrobi, błonnika i azotu w podstawowych składnikach podłoża w %, w przeliczeniu na suchą masę

Content of water, starch, nitrogen and cellulose in basic constituents of medium, in percentage of dry matter

Substrat Substrate	Woda Water	Skrobia Starch	Azot całkowity Nitrogen total	Błonnik surowy Cellulose crude
Mieszanka Dried potato pulp-wheat bran	7,11	45,70	1,89	8,49
Młóto Brewer's grain	5,58	3,43	4,33	15,53
Szlam krochmalniczy Starch slime	13,17	63,70	1,66	—

Pożywki: Jako wyjściową dawkę podłoża przyjęto 10 g młóta bez dodatków, bądź 10 g mieszaniny młóta i skrobi. Ponieważ chcieliśmy zachować te same stosunki młóta do skrobi, masa podłoża w doświadczeniu II (zastąpienie skrobi szlamem) oraz w doświadczeniu III (dodatek substancji azotowych) ulegała zwiększeniu ponad 10 g (tabela II). Moment ten uwzględniono jednak przy obliczaniu sumy aktywności podłoża (ilość wytworzonych enzymów), odnosząc ją nie do całości, ale do takiej jego ilości, jaką uzyskano by z 10 g podłoża wyjściowego. W ten sposób wszystkie te wyniki są porównywalne z wynikami prac poprzednich, w których masa podłoża zawarta na 1 szalce wynosiła zawsze ściśle 10 g.

Pożywkę azotową dodawano w postaci wodnych roztworów azotanu sodu lub azotanu amonu, co opisano szczegółowo w doświadczeniu III. Skrobię w suchej postaci dodawano do młóta uprzednio zwilżonego, co zapewniało dokładne wymieszanie składników podłoża.

Pleśnie: Doświadczenia przeprowadzono przy użyciu dwóch szczepów *Aspergillus oryzae — Went* i 3b (Kujawski i Piller 1959).

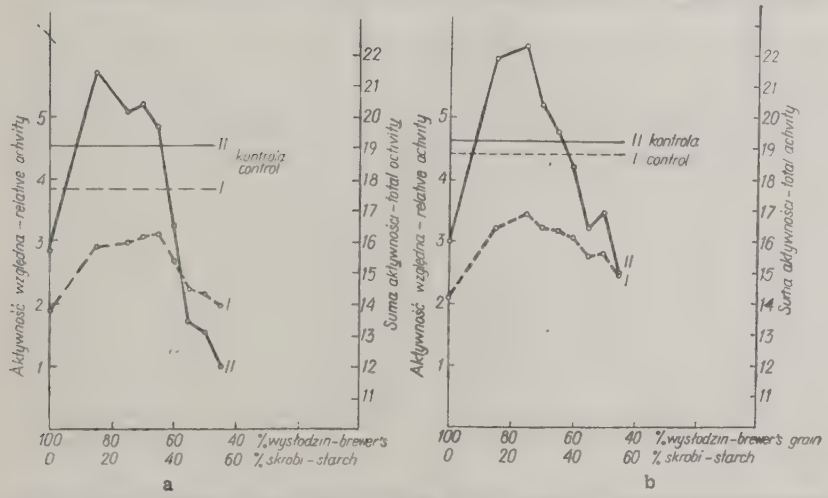
Szczepienie, hodowla: Kultury wyjściowe hodowano na agarze Czapeka z 2% skrobi. Podłoże właściwe szczepiono zawiesiną zarodników. Czas hodowli wynosił dla szczepu *Went* 4 dni, dla szczepu *3b* — 5 dni. Suszenie i przygotowanie preparatów do analiz oraz oznaczenie aktywności amylolitycznej opisano w I części pracy (Kujawski i Piller 1958).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Doświadczenie I

Wzbogacenie młóta w źródło węgla — skrobia „Superior"

W doświadczeniu tym prowadzono hodowlę pleśni na podłożu z młóta z dodatkiem 15-55% skrobi. Jako próby kontrolne służyły kultury



Rys. 1. Wpływ dodatku skrobi „Superior" do wysłodzin na tworzenie przez pleśnie enzynów amylolitycznych

– – – – aktywność 1 g podłoża w g maltozy w przeliczeniu na powietrznie suchą masę

——— suma aktywności podłoża w g maltozy w przeliczeniu na powietrznie suchą masę

a— szczep *Went* — czas hodowli 4 dni

b— szczep 3b — czas hodowli 5 dni

Fig. 1. Effect of addition of starch „Superior" to the brewer's grain on the production of amylolytic enzymes

– – – activity of 1 gram of preparation in grams of maltose, calculated on air dry matter

——— total activity of preparation in grams of maltose, calculated on air dry matter

a — strain *Went* — time of incubation 4 days

b — strain 3b — time of incubation 5 days

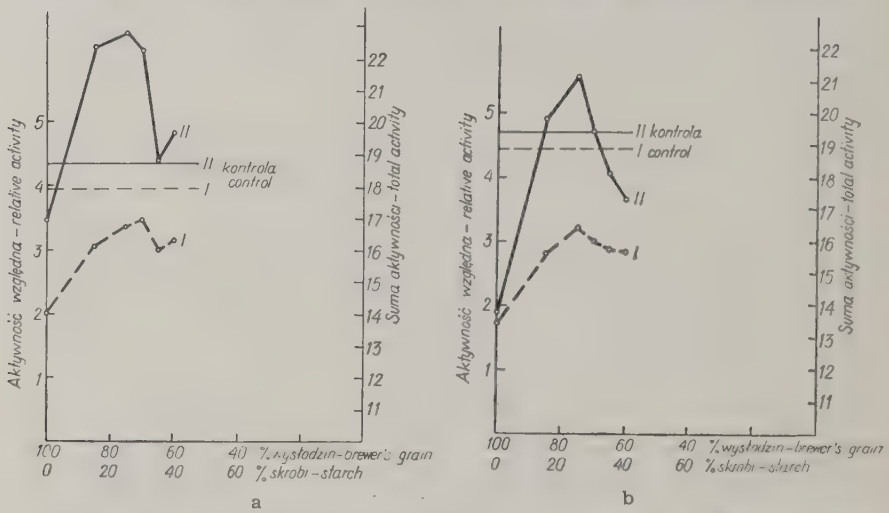
wyrosłe na mieszance (otręby pszenne: wycierka ziemniaczana — 6 : 4). Wyniki przedstawiono na rys. 1.

Mimo niższej, w porównaniu z kontrolą, aktywności preparatów ze względu na wysoką „sumę aktywności" podłoża (Kujawski i Piller 1959) zakwalifikowano młóto do dalszych doświadczeń.

Doświadczenie II

Wzbogacenie młóta w źródło węgla — szlam krochmalniczy

W skali technicznej skrobia pierwszego gatunku nie będzie stosowana przy produkcji pleśniowych preparatów amylolitycznych. Opisane doświadczenie miało zatem sprawdzić możliwość zastąpienia równoważ-



Rys. 2. Wpływ dodatku szlamu krochmalniczego do wysłodzin, na tworzenie przez pleśnie enzymów amylolitycznych

– – – – aktywność 1 g podłoża w g maltozy w przeliczeniu na powietrznie suchą masę

——— suma aktywności podłoża w g maltozy w przeliczeniu na powietrznie suchą masę

a — szczep *Went* — czas hodowli 4 dni

b — szczep *3b* — czas hodowli 5 dni

Fig. 2. Effect of starch slime addition to the brewer's grain on the production of amylolytic enzymes

– – – – activity of 1 gram of preparation in grams of maltose, calculated on air dry matter

——— total activity of preparation in grams of maltose, calculated on air dry matter

a — strain *Went* — time of incubation 4 days

b — strain *3b* — time of incubation 5 days

nych ilości skrobi typu „Superior" suszonym szlamem krochmalniczym, zawierającym około 64% skrobi.

Do podłoży dodawano skrobi w postaci szlamu krochmalniczego w ilości 15-40%. Szczegółowy skład podłoży przedstawia się następująco (w g):

wysłodziny	szlam krochmalniczy
10,0	—
8,5	2,03 (= 1,5 g skrobi)
7,5	3,39 (= 2,5 g „)
7.0	4,07 (= 3,0 g „)
6,5	4,75 (= 3.5 g „)
6,0	5,42 (= 4,0 g „)

Na podłożach ze szlamem krochmalniczym pleśnie rozwijały się równie dobrze jak na młócie z dodatkiem skrobi. Wyniki z oznaczeń aktywności preparatów i obliczona suma aktywności podłoża (rys. 2) wskazują na to, że można zastąpić skrobię szlamem krochmalniczym, potwierdzają przy tym wyniki poprzedniego doświadczenia odnośnie do optymalnej ilości dodawanej do młóta skrobi.

Doświadczenie III.

Wzbogacenie młóta w źródło azotu — azotan sodu i azotan amonu

W skład substancji azotowych wysłodzin wchodzą głównie skoagulowane białka słodu. Zawartość azotu całkowitego w użytym przez nas młócie była wysoka (4,33% suchej masy). W poniższym doświadczeniu chcieliśmy sprawdzić, czy jest on przyswajalny dla pleśni i czy zaopatrzenie grzybni w składniki azotowe będzie wystarczające również po wzbogaceniu podłoża w skrobię.

Jako podłoża użyto młóta z dodatkiem szlamu krochmalniczego. Azot dodawano do podłoża przed sterylizacją, pod postacią odpowiedniej ilości roztworów wodnych $NaNO_3$ i NH_4NO_3.

Do podłoża podstawowego dodawano 0,2% i 0,4% azotu, pod postacią wspomnianych roztworów soli (pozycje 3a, 4a, 3b, 4b, w tab. II).

Do podłoży zawierających większe dawki skrobi dodawano soli azotowych w takiej ilości, aby stosunek azotu do skrobi pozostawał taki sam jak w podłożu podstawowym (tabela II, poz. 5a, 6a, 5b i 6b).

Skład stosowanych podłoży oraz wyniki z oznaczeń preparatów przedstawiono w tabeli II.

Tabela II

Wpływ dodatku soli azotowych na wytwarzanie enzymów amylolitycznych u szczepu *Went*, hodowanego na wysłodzinach ze szlamem krochmalniczym

Effect of nitrogen salts addition on the production of amylolytic enzymes in *Went* strain, cultivated on a brewer's grain and starch slime medium

L. p. №	Podłoże Medium: wysłodziny w gramach brewer's grain in g	Podłoże Medium: szlam krochmalniczy w gramach starch slime in g	Podłoże Medium: azot nitrogen	Aktywność 1 g preparatu w g maltozy activity of 1 gram of preparation in grams of maltose	Suma aktywności w g maltozy total activity in grams of maltose
1	10	—	—	1,69 1,69 1,75	14,47 14,63 14,68
2	8	2,71	—	2,65 2,65 3,03	18,93 18,93 21,39
3a	8	2,71	$NaNO_3$ 0,2% N	2,65 2,58 2,79	19,47 19,76 20,79
4a	8	2,71	$NaNO_3$ 0,4% N	2,38 2,52 2,21	18,52 19,73 17,22
5a	7	4,07	$NaNO_3$ 1,1 g	1,72 1,68 1,76	13,26 12,76 12,64
6a	6	5,42	$NaNO_3$ 2,2 g	1,03 1,03 1,07	8,36 8,48 8,92
3b	8	2,71	NH_4NO_3 0,2% N	0,89 0,89 0,96	6,62 6,54 7,00
4b	8	2,71	NH_4NO_3 0,4% N	0,34 0,31 0,31	2,69 2,40 2,51
5b	7	4,07	NH_4NO_3 0,52 g	1,17 0,93 1,07	8,06 6,39 7,42
6b	6	5,42	NH_4NO_3 1,05 g	0,75 0,65 0,62	5,59 4,73 4,59
7	mieszanka wheat bran + dried potato pulp			3,86 3,86 4,03	18,76 18,72 18,92

Uwaga: Szczep 3b dał w zasadzie takie same wyniki, jak w opisanym doświadczeniu

Note: The same results were obtained with the strain 3b

Na podstawie otrzymanych wyników można sądzić, że dodatek soli azotowych do opisanych podłoży był niecelowy.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wykonane doświadczenia potwierdziły w zupełności nasze przypuszczenia, że wysłodziny browarniane można wykorzystać w produkcji pleśniowych preparatów amylolitycznych. Podłoże to po wzbogaceniu w skrobię dawało wystarczająco dobre wyniki. Rozwój grzybni na młócie z skrobią nie ustępował rozwojowi grzybni na podłożu kontrolnym. Jedynie na podłożach z najwyższą dawką skrobi (50 i 55%) grzybnia rozwijała się nieco słabiej najwidoczniej na skutek silnie klajstrowatej konsystencji. Uważamy, że przyczyną bujnego rozwoju grzybni był nie tylko skład chemiczny użytego podłoża, ale przede wszystkim jego korzystna struktura fizyczna. Obecność dużych ilości łuski w młócie powodowała spulchnienie podłoża, umożliwiając tym samym jego lepsze napowietrzenie.

Aktywność otrzymanych preparatów, jak również suma aktywności podłoża, tylko w pewnym zakresie zależały od intensywności rozwoju grzybni. Wartości te osiągały maksimum przy określonym, optymalnym składzie podłoża (15 - 25% skrobi), ulegając wyraźnej obniżce w miarę zwiększania zawartości skrobi w podłożu. Aktywność 1 g preparatu była wyższa w próbach kontrolnych (*Went* — 3,85, *3b* — 4,40) aniżeli na młócie z optymalnym dodatkiem skrobi (*Went* — 3,10, *3b* — 3,44). Natomiast „suma aktywności" podłoża, którą uznaliśmy za bardziej miarodajną (K u j a w s k i i P i l l e r 1959), była w przypadku obu szczepów pleśni wyższa na podłożu z młótem (rys. 1). Różnice te wynikały z niejednakowego ubytku masy podłoża w czasie trwania hodowli. Podłoże z młotem zawierające duże ilości niestrawnego błonnika ulegało w mniejszym stopniu zużyciu, co pociągało za sobą pozorne obniżenie aktywności enzymatycznej, przypadającej na 1 g preparatu.

Okazało się, że badane szczepy pleśni wytwarzały najwięcej enzymów na podłożu zawierającym najwięcej błonnika w postaci łusek. Stwierdzono również, że suma aktywności podłoża była wyższa w podłożach bogatszych w azot, malała natomiast przy zwiększaniu dawek skrobi ponad 30%. Tabela III obrazuje słuszność naszych przypuszczeń.

Próbę zastąpienia skrobi szlamem krochmalniczym (doświadczenie II) uważać należy za całkowicie udaną, ponieważ zarówno rozwój pleśni, jak i wyniki uzyskane z oznaczeń aktywności nie są gorsze aniżeli wyniki otrzymane w doświadczeniach ze skrobią „Superior" (doświadczenie I). Szlam krochmalniczy jest więc dodatkiem równie cennym, jak skrobia i znacznie od niej tańszym, a jego zastosowanie w skali technicznej do produkcji preparatów amylolitycznych może okazać się opła-

Tabela III

Zależność sumy aktywności preparatu od zawartości błonnika i azotu w podłożu
Relationship between the activity of preparation and content of cellulose and nitrogen in medium

Podłoże Medium		Błonnik w % suchej masy Crude cellulose in % dry matter	Azot całkowity w % suchej masy Total nitrogen in % dry matter	Suma aktywności w g maltozy Total activity in grams of maltose	
				Went	*3b*
Mieszanka wheat bran+potato pulp		8,49	1,89	19,09	19,20
Młóto Brewer's grain	Skrobia Starch				
w procentach p. c.					
85	15	13,20	4,02	21,44	21,94
75	25	11,65	3,81	20,16	22,27
70	30	10,87	3,71	20,38	20,35
65	35	10,10	3,60	19,80	19,52
60	40	9,32	3,50	16,53	18,36

calne. Dodatek szlamu krochmalniczego w ilości około 20% w przeliczeniu na skrobię — wydaje się najbardziej korzystny. Przy zbliżonych dawkach skrobi (czy też odpowiednich ilości szlamu) uzyskiwano podobne wyniki. Ponieważ najwyższą sumę aktywności uzyskiwano przy zawartości skrobi w podłożu w granicach 15 - 25% (średnio 20% skrobi), dlatego w dalszych badaniach podłoże złożone w 80% z młóta i w 20% ze skrobi (w postaci szlamu krochmalniczego) przyjęto za podstawowe.

Okazało się też, że w podłożu podstawowym (8 g młóta + 2,71 g szlamu) oraz wzbogaconym w skrobię, azot nie był czynnikiem ograniczającym, przeciwnie, dodatek soli azotowych obniżał aktywność uzyskanych preparatów. Być może, że zjawisko to wywołane było zbyt dużym stężeniem dodawanych soli. Ciekawy jest fakt szkodliwego działania azotanu amonu (soli fizjologicznie obojętnej) przy znacznie mniej szkodliwym wpływie azotanu sodu (soli fizjologicznie zasadowej).

Doświadczenia prowadzono z konieczności na materiale suszonym (suszone młóto i suszony szlam krochmalniczy). Przewidujemy, że produkcja preparatów amylolitycznych prowadzona będzie w browarze lub w krochmalni. Możliwe jest więc, że w praktyce składniki podłoża nie będą wymagały uprzedniego suszenia. Nie wykluczamy też możliwości zastąpienia szlamu krochmalniczego innym materiałem wysokoskrobiowym, np. świeżą lub suszoną wycierką ziemniaczaną, przy przestrzeganiu jednak optymalnej zawartości skrobi w podłożu i odpowiedniej wilgotności podłoża.

WNIOSKI

1. Stwierdzono, że w próbach laboratoryjnych używane dotychczas podłoże z otrąb pszennych i suszonej wycierki ziemniaczanej (6 : 4) można zastąpić tanim odpadem przemysłu rolnego — wysłodzinami browarnianymi.

2. Podłoże takie należy uprzednio uzupełnić skrobią lub innym wysoko skrobiowym materiałem. Odpowiednim źródłem skrobi okazał się szlam krochmalniczy.

3. Optymalny dla wytwarzania enzymów amylolitycznych skład podłoża wynosi: 75 - 80% młóta i 25 - 20% skrobi (w formie odpowiedniej ilości szlamu krochmalniczego).

4. Podłoże takie nie wymagało dodatku soli azotowych, zaś wpływ $NaNO_3$ i NH_4NO_3 był niekorzystny. Szczególnie wyraźnie zaznaczyło się szkodliwe działanie azotanu amonu.

Pracę tę wykonaliśmy pod kierunkiem prof. dra Franciszka Nowotnego, za co składamy serdeczne podziękowanie.

LITERATURA

Chruściel M., 1957: Próba zastąpienia otrąb w produkcji preparatów amylolitycznych. Praca dyplomowa wykonana w Katedrze Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Krakowie (maszynopis).

Kalendarz Przemysłu Spożywczego, 1954: Warszawa, *WPLiS*.

Kujawski M., Piller K., 1958: Badania nad otrzymywaniem preparatów enzymatycznych-amylolitycznych. I. *Acta Microbiol. Polon.*, **7** : 299.

Kujawski M., Piller K., 1959: Badania nad otrzymywaniem pleśniowych preparatów enzymatycznych — amylolitycznych. II. *Acta Microbiol. Polon.*, **8** : 299.

Mitiukow A. D., 1959: Apparat dla wyraszczywanija plesniewych gribow na kartofielnoj miezgie. *Spirt. Prom.*, **3** : 13.

Pawlowski-Doemes A., 1938: Die Brautechnischen Untersuchungsmethoden. 5 Aufl. Münch., Berlin, R. Odelbourg Verl.

Sosina M., 1958: Wyraszcziwanije plesniewych gribow na otchodach krachmalnogo praizwadstwa. *Spirt. Prom.*, **1** : 11.

Sova V., Nahrada obilnich lihovarskych sladu amylolytickymi preparaty plisnowymi. *Prumysl vyziv*, **1** : 261.

Sova V., 1953: Amylasy jej ich ucinek a pouziti. *Prumysl potravin*, **4** : 151.

Struszyński M., Analiza ilościowa i techniczna. Warszawa *PWT*.

M. Kujawski and *K. Piller*

STUDIES ON THE PRODUCTION OF FUNGAL AMYLASES PART III. THE APPLICATION OF BREWER'S GRAIN IN THE PRODUCTION OF AMYLOLYTIC PREPARATIONS

Summary

1. Two strains of *Aspergillus oryzae* (*Went*, 3b) were cultivated on a medium consisting of brewer's grain with various additions of starch. Control tests were conducted on a medium of wheat bran and dried potato pulp (6 : 4).

2. It was shown, that the medium containing 75 - 80% of brewer's grain and 25 - 20% of starch was quite satisfactory; the activity of enzymes produced by moulds on that medium was even greater than on the control substrat.

3. The starch in the medium could be substituted completely by suitable quantity of starch slime.

4. It was ascertained that addition of nitrogen compounds to the examined medium was unnecessary.

KSIĄŻKI OTRZYMANE

Virus virulence and pathogenicity (Zjadliwość i patogenność wirusów), pod red. G. E. W. Wolstenholm'a i C. M. O'Connor. Ciba Foundation Study Group Nr 4, str. 114. J. a. A. Churchill Ltd, London, 1960, 12s 6d.

Ta mała książeczka jest czwartym z kolei, w serii wydawanych przez firmę Churchill, sprawozdań jednodniowych sympozjów dyskusyjnych, zwoływanych przez Fundację Ciba.

Sympozjum, pod przewodnictwem Burneta odbyło się w czerwcu 1959 r. dla uczczenia J. Muldera. Obejmuje ono, poza wstępnym słowem przewodniczącego, 6 doniesień: 1) Definicja i pomiary zjadliwości wirusów (C. H. Stuart-Harris), 3) Czynniki komórkowe gospodarza i zjadliwość wirusów (H. R. Morgan), 3) Wpływ zmian pasożyta i gospodarza na zjadliwość (C. H. Andrews), 4) Dalsze aspekty problemu zjadliwości dla ludzi u wirusa grypy (J. Mulder), 5) Ostry przebieg grypy jako funkcja wrażliwości gospodarza (E. D. Kilbourne), 6) Zjadliwość dla człowieka niektórych wirusów dróg oddechowych, pasażowanych przez hodowle tkankowe (D. A. J. Tyrrel i F. E. Buckland). Dołączone są też szczegółowe sprawozdania z dyskusji po każdym referacie i końcowej — ogólnej dyskusji.

Książka ta zawiera wiele nowego materiału, nigdzie jeszcze nie publikowanego, rzucającego nowe światło na zagadnienie wirulencji wirusa grypy. Jest ona cennym uzupełnieniem obszerniejszych monografii.

W. Kunicki-Goldfinger

SPIS TREŚCI — CONTENTS

Str.
Page

1. Prof. dr Kazimierz Bassalik 235
2. W. Nicewicz: Postacie przesączalne prątków gruźlicy i ich rola w procesie zakażenia 239
   Filterable forms of tubercle bacilli and their role in the infection. A review 239
3. Z. Kwiatkowski: Radiation action on the mitotic crossing-over in *Aspergillus nidulans*
   Wpływ promieniowania na mitotyczne crossing-over u *Aspergillus nidulans* : : 253
4. M. Bedryńska-Dobek: Déterminations des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques, du pouvoir pathogène et de la résistance aux antibiotiques de 9 souches d'*Actinobactérium* et 2 d'*Actinomyces bovis* après le lyophilisation
   Właściwości morfologiczne, hodowlane, biochemiczne, zdolności chorobotwórcze oraz wrażliwość na antybiotyki 9 szczepów *Actinobacterium* oraz *Actinomyces bovis* po liofilizacji 261
5. S. Bujak, A. Imielski i I. Zakrzewska: Próby zastąpienia mąki jęczmiennej autolizatami drożdży, wycierką ziemniaczaną i wodą sokową jako dodatkami do zacierów melasowych fermentacji acetonowo-butanolowej.
   The suitability of yeast autolysates, potato-pulp and starch factory water as addition to molasses mash in acetone-butyl alcohol fermentation 269
6. J. Kovats: Badania nad fermentacją cytrynową wgłębną.
   Untersuchungen über die submerse Gärung von Zitronensäure . . . 275
7. M. Kujawski i K. Piller: Badania nad otrzymywaniem pleśniowych preparatów enzymatycznych-amylolitycznych. III. Próby zastosowania wysłodzin browarnianych (młóta) do produkcji pleśniowych preparatów amylolitycznych.
   Studies on the production of fungal amylases. III. The application of brewer's grain in the production of amylolytic preparations 290

Recenzje: *Virus virulence and pathogenicity* 299

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej, nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja „*Acta Microbiologica Polonica*", Wrocław, skrytka pocztowa nr 73.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) muszą być uprzednio akceptowane przez tłumacza Redakcji; należy do nich dołączyć wersję polską i streszczenie w języku polskim. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku polskim oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, dwukropek, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie, 75 odbitek nie zszywanych — po cenie zryczałtowanej (około 2 zł za stronę druku).

* *
*

Zgodnie z poleceniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, począwszy od tomu X (rocznik 1961) prace oryginalne będą publikowane w języku angielskim lub francuskim.

Zmiana ta będzie stopniowo wprowadzana w życie już w 1960 r.

W związku z powyższym objętość prac zostanie ograniczona do maksimum 1 arkusza wydawniczego. Prace mogą być nadsyłane w wersji polskiej z załączonym słownikiem stosowanych terminów fachowych w języku publikacji. Tłumaczenie w takim przypadku wykona Redakcja na koszt autora. Prace przygotowane w wersji obcej muszą uprzednio uzyskać akceptację jednego z tłumaczów Redakcji. Do wersji obcej należy dołączyć 1 egzemplarz w wersji polskiej.

Cena zł 25.—

Warunki prenumeraty kwartalnika

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

Cena w prenumeracie zł 100,— rocznie
zł 50,— półrocznie

Zamówienia i wpłaty przyjmują:

1. Przedsiębiorstwo Upowszechniania Prasy i Książki „Ruch" Wrocław, ul. Oławska 10/11, konto PKO nr 8-6-13768
2. Urzędy pocztowe

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch", Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100-024.

Bieżące numery do nabycia w księgarniach naukowych „Domu Książki" oraz w Ośrodku Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych Polskiej Akademii Nauk — Wzorcownia Wydawnictw Naukowych PAN — Ossolineum — PWN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter).

Prenumeratę na rok 1961 przyjmują od dnia 15 listopada 1960:

Przedsiębiorstwo Upowszechniania Prasy i Książki „Ruch" Wrocław, ul Oławska 10/11, konto PKO nr 8-6-13768 oraz w całym kraju urzędy pocztowe, listonosze i delegatury „Ruchu"

Tylko prenumerata zapewnia regularne otrzymywanie czasopisma